

# 長崎県の森林資源における機能性物質の探索

前田 一

Exploration of functional chemical compounds in Nagasaki forest resources

Hajime Maeda

## 目次

第1章 緒論	4
第2章 森林資源の総ポリフェノール含量の比較	6
1 はじめに	6
2 長崎県内の森林に生育する植物の総ポリフェノール含量	6
1) 植物採集と総ポリフェノール含量の測定	6
2) 総ポリフェノール含量の比較	6
3 小括	8
第3章 香木ノグルミの含有成分および熱処理時の成分変化	12
1 ノグルミについて	12
2 ノグルミ材に含まれる揮発性成分の探索	12
1) 抽出と分離	12
2) 既知化合物の同定	12
3) 新規化合物の構造解析	13
(1) 化合物 <b>2, 3, 4</b> の絶対配置について	17
(2) ノグルミ材の加熱時における揮発性成分	17
3 ノグルミ材の熱処理前後の成分変化	18
1) はじめに	18
2) 抽出と分離	18
3) 既知化合物の同定	19
4) 新規化合物の構造解析	20
5) 熱処理前後の成分変化	23
4 小括	25
第4章 ゴンズイに含まれるフェノール成分	26
1 ゴンズイについて	26
2 葉に含まれるフェノール成分	26
1) 抽出と分離	26
2) 既知化合物の同定	27
3) 新規化合物の構造解析	27
3 樹皮に含まれるフェノール成分	30
1) 抽出と分析	30

2) 既知化合物の同定	30
4 小括	30
第5章 ヤマハゼのフェノール成分	31
1 ヤマハゼについて	31
2 ヤマハゼ材のフェノール成分	31
1) 抽出と分離	31
2) 既知化合物の同定	31
3) 新規化合物の構造解析	33
3 ORAC法によるヤマハゼ含有成分の抗酸化活性の評価	33
4 小括	35
第6章 イヌマキの果実の成分	36
1 イヌマキについて	36
2 イヌマキの果托の成分	36
1) 抽出と分離	36
2) 既知化合物の同定	38
3) 新規化合物の構造解析	40
3 イヌマキの種子の成分	48
1) 抽出と分離	48
2) 既知化合物の同定	49
3) 新規化合物の構造解析	50
4 果実に含まれるプロアントシアニジン類の構造解析	55
5 小括	58
第7章 シイタケ栽培条件の違いによる eritadenine 含有量の変化	59
1 シイタケの菌床栽培と eritadenine について	59
2 Eritadenine の単離	60
3 異なる樹種のチップで栽培したシイタケの eritadenine 含有量	61
1) シイタケ栽培の条件	61
2) Eritadenine の抽出条件の検討	61
3) 異なる栽培条件下での eritadenine 含有量の比較	62
4 小括	63
第8章 総括	64
謝辞	66
実験の部	67
引用文献	82
Summary	86

略語一覽

$^1\text{H}$ -NMR : Proton nuclear magnetic resonance

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY : Proton-proton homonuclear correlated spectroscopy

$^{13}\text{C}$ -NMR : Carbon-13 nuclear magnetic resonance

FAB-MS : Fast atom bombardment mass spectrometry

Fr. : Fraction

HMBC : Proton-detected heteronuclear multiple bond correlation

HPLC : High performance liquid chromatography

HR-FAB-MS : High resolution fast atom bombardment mass spectrometry

HSQC : Proton-detected heteronuclear single quantum coherence

IR : Infrared

MALDI-TOF-MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight  
mass spectrometry

NOE : Nuclear Overhauser effect

NOESY : Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy

TFA : Trifluoroacetic acid

TLC : Thin-layer chromatography

$t_{\text{R}}$  : Retention time

UV : Ultraviolet

## 第1章 結論

長崎県は、日本列島の西端に位置し、海洋の影響を受けている離島・半島の面積が県土の約4割であり、残りの6割が内陸性の気候条件となっている<sup>1)</sup>。県土の最西端は鳥島の東経128°06'，ついで男女群島の東経128°21'，東端は島原の東経130°23'であり，南端は男女群島の北緯31°58'，北端は対馬北部の北緯34°44'である。経度幅は2°17'で約200km，緯度幅は2°46'で約300kmに相当し，この東西南北の広がり，九州本島と同規模である<sup>2)</sup>。

このような地理的特異性を持つため，長崎県の自然環境は多様であり，そこで生育している森林の状況は，海岸の低木群落から丘陵地の照葉樹林をへて，山地の落葉樹林へとつづき，その面積は約24万ヘクタールで県全体面積の6割を占めている。長崎県の植物相の主な特徴は，暖地系の植物が多く，そのうちいくつかは県内に分布北限地があり，さらに冷温帯系の日本固有種の西限地がある一方，朝鮮半島を介して東に分布が広がる大陸系植物を他県より多く有することである<sup>3)</sup>。

このように，森林は自然環境や立地条件に影響を受けながら，自然環境を構成する重要な水源のかん養，土壌の保全，二酸化炭素の吸収など私たちの生活に深く関わる公益的機能を発揮している。一方，森林は，建築用材や製紙パルプなど木質材料はもとより，きのこ類や椿油などの原料を供給する森林資源としての役割も大きい<sup>4)</sup>。

その森林の中で主要な構成因子である樹木は，樹冠，幹，根からなり，樹冠を構成している葉は光合成によって二酸化炭素と水から炭水化物を生産し，樹体の成長・維持のための材料およびエネルギー源を供給する。幹は樹皮と木部からなり，樹冠を支えて根からの水分，無機物質および光合成で生産された代謝物質の通道器官で，肥大成長を行う。根は，土壌中の水分および無機物質を吸収するとともに樹体を支える役割をしている<sup>5)</sup>。

幹の大半を占める木部は，細胞壁と細胞間層を構成する主成分と，細胞内腔や樹脂細胞

などに含まれ水や有機溶媒によって抽出可能な副成分で構成されている。主成分は，セルロースやヘミセルロース，リグニンであり，その合計は約9割を占める。副成分は，オリゴ糖などの糖類や芳香族化合物，テルペン類などで樹種や組織部位，成長段階などで成分組成が異なる。これら樹木の副成分は10%に達しないが，樹木が生存するために必要不可欠な成分である。例えば，樹木の幹において，樹皮に近い辺材部では生きた細胞で構成され，組織が障害を受けたときにはそれら生きた細胞が様々な生物学的生体防御反応を示す。一方，中心部に近い心材部は死細胞で構成されるため，心材部と辺材部の境界にある移行部で多量に副成分が生成され，蓄積されたポリフェノールやテルペノイド類が化学的な生体防御の役割を担っている。また，幹以外の葉，樹皮，根にも多種多様な副成分が含まれている。

近年，そのような植物の含有成分に着目した製品開発が進められている。例えば，植物ポリフェノールは，植物界に非常に広く分布し，様々な健康維持効果をもつ薬草や食品の成分として世界的に注目され続けているが，未だに化学的な解明が進んでいない植物も多く残されている<sup>6,7)</sup>。

一方，国内の森林資源を取り巻く現状は，外国からの木材輸入や代替材料の台頭など時代の変遷とともに厳しくなっており，未利用の資源が増えてきている。日本の木材自給率は現在20%であり<sup>4)</sup>，輸入材に依存している現状を表している。

そこで，本研究では，森林資源が有する含有成分を活用した新たな用途開発へつなげるための基礎資料を得ることを目的として，現在，未利用，または利用されているものの機能性物質などの知見が得られていない森林資源に着目し，それらに含まれる成分について精査した。

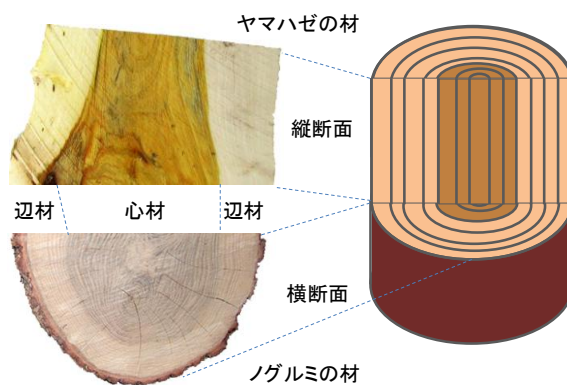
第2章では，森林に生育する植物が含有する成分について，総ポリフェノール含量，TLCおよびHPLC分析により評価した。

第2章の結果を踏まえ、第3章では香木として利用可能なノグルミの材、第4章と第5章ではこれまでフェノール成分について検討されていないゴンズイの葉及びヤマハゼの材について、成分を精査した。

第6章では、長崎県の平戸地域に広く自生するイヌマキを対象とした。その果実は、種子と果托で構成され、種子は有毒といわれているが、果托は食用可能である。しかし、こ

れまで成分については報告がされていないため、検討を行った。

さらに、第7章では、長崎県の重要な特産品であるシイタケについて、その生理活性物質として知られる eritadenine の含有量と栽培条件との関連について検討を行うことで、シイタケの品質向上に資するべく研究を行った。



樹木の木部と断面写真

## 第2章 森林資源のポリフェノール含量の比較

### 1 はじめに

長崎県の面積は、土地全体が約40万ヘクタール、そのうち森林が約24万ヘクタールで、森林率60%となっている。長崎県の地形の特徴は、急峻な地形と脆弱な地質が多いことと、北海道に次ぐ全国2位の海岸線（約4千km）を有することである。そのような環境の多くに接している森林は、水源かん養や山地災害防止機能だけでなく、漁場の環境を保全する魚つき機能などの役割を担っている。

しかしながら、長期にわたる木材価格の低迷や森林の管理費用の高騰による林業採算性の悪化は森林所有者の経営意欲の減退と担い手の減少を招き、管理不十分な森林が増加しつつあり、これまで林業経営により保たれてきた森林の公益的機能の低下が危惧されている。つまり、森林を持続可能な資源として活用していくことが森林の公益的機能を発揮させることであり、木材や製紙パルプといった利用にとどまらない、新たな用途開発による森林資源の活用が森林の保全管理につながると考えられる。

緒論でも述べたとおり、植物には、近年、機能性素材として注目されている多種多様なポリフェノールが含有されている。様々な植物について総ポリフェノール含量を評価することは、有用な天然物化合物を探索する上での指標になると考えられ<sup>8)</sup>、それらの情報を体系的に管理していくことが、今後の用途開発につながると考えられる。そこで、第1章では、長崎県内の森林に生育する植物について組織部位別に総ポリフェノール含量を比較し、その後の成分探索への基礎データを収集すべく実験を行った。

### 2 長崎県内に生育する植物の総ポリフェノール含量

#### 1) 植物採集と総ポリフェノール含量の測定

長崎県の森林には、61科268種の植物が存在することが「長崎県の森林と樹木（1990）」に記されている<sup>3)</sup>。その中で資源として重要と思われる26科35属46種について組織部位別に収集し、136サンプルを得た（Table 1）。各サンプルは70%含水エタノール（1g / 5ml または 1g / 15ml）で抽出し、フォーリンチオカルト法によって抽出液の

総ポリフェノール含量を測定した<sup>7,9)</sup>。総ポリフェノール含量は、各サンプルの測定値をgallic acidで作成した検量線をもとに試料1g当たりの含有量（mg）に換算したものを使用した。

#### 2) 総ポリフェノール含量の比較

Fig. 2に示した試料について、定性的にTLCおよびHPLC分析を行ったところ、ツブラジイとコナラの樹皮はプロアントシアニジンとエラジタンニン、ホルトノキの材はガロタンニン類、ヤマモモの樹皮はプロアントシアニジンとフラボノール配糖体、ノグルミの葉はエラジタンニン、ヤマハゼの材はガロタンニンとフラボノイド類などのポリフェノールを含むことが明らかになった。Fig. 3にヤマハゼの材とツブラジイの樹皮のHPLCプロファイルを示す。

26科35属46種の材・葉・樹皮など136サンプルについて総ポリフェノール量を測定した（Table 2）。

まず、各サンプルを科ごとに分類し、その平均値を用いて総ポリフェノール含量を比較した結果（Fig. 1）、ウルシ科、ホルトノキ科、ヤマモモ科、クルミ科での値が大きかった。

次に、各サンプルの総ポリフェノール含量について比較した（Fig. 2）。組織部位別に比較してみると、100mg/g以上の含量を示したサンプルが5種類存在した。ウルシ科ではヤマハゼの材、ホルトノキ科ではホルトノキの材、ヤマモモ科ではヤマモモの樹皮、クルミ科ではノグルミの葉の値が大きかった。

ヤマモモの樹皮は楊梅皮として生薬原料になっており、ポリフェノールを多く含有していることが知られている。また、ウルシ科のヤマハゼについてはこれまで報告がないが、同じウルシ科スルデ属7種では抗酸化活性をはじめ多くの生理活性について評価されており、ポリフェノールの関与が示唆されている<sup>10)</sup>。総ポリフェノール含量は今後の用途開発に向けた判断指標として活用できると考えられる。

また同一種であっても、材や葉、樹皮など組織部位によって含有成分が異なる。そこで、総ポリフェノール含量を組織部位別に比較した結果、

Table 1 長崎県内から収集したサンプル一覧

科	属	種
イネ科	マダケ属	クレタケ ハチク
ウコギ科	カクレミノ属 ヤツデ属	カクレミノ ヤツデ
ウルシ科	ウルシ属	ヤマハゼ
キブシ科	キブシ属	キブシ
キョウチクトウ科	キョウチクトウ属	キョウチクトウ
クスノキ科	カゴノキ属 クスノキ属 クロモジ属 タブノキ属 ハマビワ属	カゴノキ バリバリノキ クスノキ アオモジ タブノキ ハマビワ
クマツツラ科	ムラサキシキブ属	ヤブムラサキ
グミ科	グミ属	ナワシログミ
クルミ科	ノグルミ属	ノグルミ
クワ科	イチジク属	アコウ イヌビワ ホソバイヌビワ
センダン科	センダン属	センダン
ツバキ科	ツバキ属 ヒサカキ属	ヤブツバキ ヒサカキ
ユズリハ科	ユズリハ属	ユズリハ
トベラ科	トベラ属	トベラ
ニレ科	エノキ属	エノキ
ハイノキ科	ハイノキ属	クロキ
バラ科	シャリンバイ属	シャリンバイ
ブナ科	コナラ属 シイノキ属	アベマキ アラカシ ウバメガシ ウラジロガシ カシワ クヌギ コナラ スタジイ ツブラジイ
ホルトノキ科	マテバシイ属 ホルトノキ属	マテバシイ ホルトノキ
マキ科	マキ属	イヌマキ
マメ科	ネムノキ属	ネムノキ
ミツバウツギ科	ミツバウツギ属	ゴンズイ
モクセイ科	イボタノキ属 ヒトツバタゴ属	ネズミモチ ヒトツバタゴ
ヤブコウジ科	ツルマンリョウ属	タイミンタチバナ
ヤマモモ科	ヤマモモ属	ヤマモモ
ユリ科	シオデ属	サルトリイバラ
26科	35属	46種

ゴズイは材での含有量が少なく、ヤマモモは樹皮に多量のポリフェノールを含有し、アベマキは葉や樹皮と比べて材にポリフェノールを多く含んでいた (Fig. 4).

これまでに多くの研究によって総ポリフェノール含量と抗酸化活性には相関関係があることが明らかにされている<sup>11-14)</sup>。今回の検討から、植物分類群によって総ポリフェノール含量が異なることが明らかになり、総ポリフェノール含量が多い樹種については抗酸化を目的とした機能性素材としての応用が期待される。

今回の検討で総ポリフェノール含量の高かった植物については、すでに成分精査が行われているものもあるが、ノグルミの材については TLC 分析の結果、ポリフェノール以外に特徴的な未知の脂溶性成分の存在が認められたので、詳細に検討を行った。ゴズイについてはこれまで全くポリフェノール成分について研究報告がなく、また、ヤマハゼの材については数種のフラボノイドの存在が明らかにされているだけであったので、これらのポリフェノール類についても分離・構造解析を行うこととした。

### 3 小括

長崎県内の森林からサンプリングした 26 科 35 属 46 種について総ポリフェノール含量を科別に比較した結果、ウルシ科、ホルトノキ科、ヤマモモ科、クルミ科での値が大きかった。

総ポリフェノール含量の多かったサンプルについて TLC および HPLC 分析を行った結果、ブナ科のツブラジイとコナラの樹皮はプロアントシアニジンとエラジタンニン、ホルトノキ科のホルトノキの材はガロタンニン類、ヤマモモ科のヤマモモの樹皮はプロアントシアニジンとフラボノール配糖体、クルミ科のノグルミの葉はエラジタンニン、ウルシ科のヤマハゼの材はガロタンニンとフラボノイド類を主に含むことが明らかになった。

今回の検討で総ポリフェノール含量の高かった植物の中には、すでに成分精査が行われているものもあるが、ノグルミの材についてはポリフェノール以外に特徴的な未知の脂溶性成分の存在が認められ、また、ミツバウツギ科のゴズイについてはポリフェノール成分についてこれまで全く研究報告がなく、ヤマハゼの材については数種のフラボノイド配糖体等の存在が明らかにされているだけであった。よって、これら樹種の含有成分について検討を進めることとした。



Table 2 長崎県の森林から採集した植物の総ポリフェノール含量

単位:mg/g fresh sample

科(和名)	属(和名)	種(和名)	組織部位				
			葉	材	樹皮	実	茎
イネ科	マダケ属	クレタケ	12				
		ハチク	13				
ウコギ科	カクレミノ属	カクレミノ	4	7	29		
	ヤツデ属	ヤツデ	9				
ウルシ科	ウルシ属	ヤマハゼ		124			
キブシ科	キブシ属	キブシ	30			29	
キョウチクトウ科	キョウチクトウ属	キョウチクトウ	11				
クスノキ科	カゴノキ属	カゴノキ	44	33			
		バリバリノキ	22	8			
	クスノキ属	クスノキ	17	8			
	クロモジ属	アオモジ	9				
	タブノキ属	タブノキ	20	7	48		
	ハマビワ属	ハマビワ	5	18			
クマツヅラ科	ムラサキシキブ属	ヤブムラサキ	15				
グミ科	グミ属	ナワシログミ	13				
クルミ科	ノグルミ属	ノグルミ	234	27	45		
クワ科	イチジク属	アコウ	7				
		イヌビワ	3	5	7		
		ホソバイヌビワ	2				
センダン科	センダン属	センダン	11				
ツバキ科	ツバキ属	ヤブツバキ	34	19	36		
	ヒサカキ属	ヒサカキ	20				
トベラ科	トベラ属	トベラ	5				
ニレ科	エノキ属	エノキ	8	17			
ハイノキ科	ハイノキ属	クロキ	9	2	33		
バラ科	シャリンバイ属	シャリンバイ	14				
ブナ科	コナラ属	アベマキ	49	28	24		
		アラカシ	45				
		ウバメガシ	60				
		ウラジログシ	72	12			
		カシワ		17			
		クスギ	54	15			
		コナラ	67	25	81		
	シイノキ属	スダジイ	33	42	70		
		ツブラジイ	52	18	129		
マテバシイ属	マテバシイ	16	22	70			
ホルトノキ科	ホルトノキ属	ホルトノキ	68	109			
マキ科	マキ属	イヌマキ	23	3	19		
マメ科	ネムノキ属	ネムノキ	10				
ミツバウツギ科	ミツバウツギ属	ゴンズイ	43	2	46		
モクセイ科	イボタノキ属	ネズミモチ	13				
	ヒトツバタゴ属	ヒトツバタゴ	20				
ヤブコウジ科	ツルマンリョウ属	タイミンタチバナ	17				
ヤマモモ科	ヤマモモ属	ヤマモモ	33	50	206		
ユリ科	シオデ属	サルトリイバラ	10				8
ユズリハ科	ユズリハ属	ユズリハ	5				
26科	35属	46種					

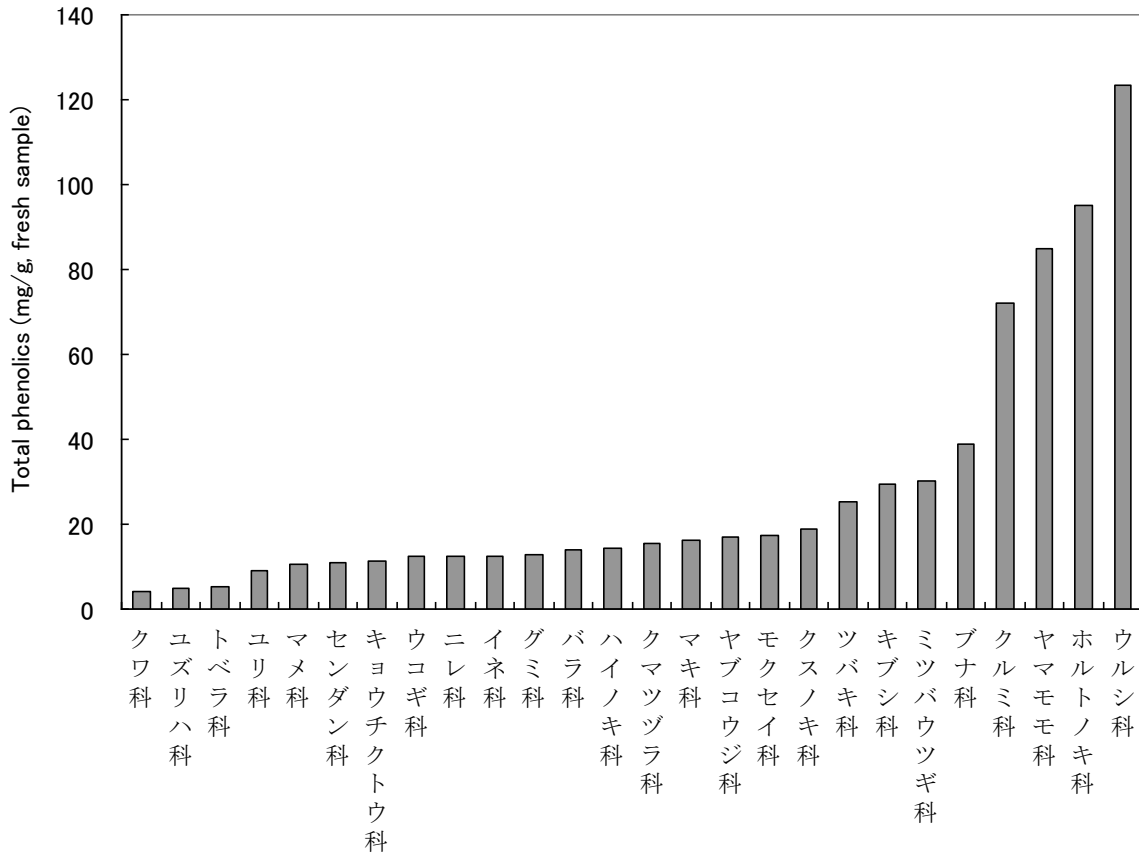


Fig. 1 植物分類群別の総ポリフェノール含量

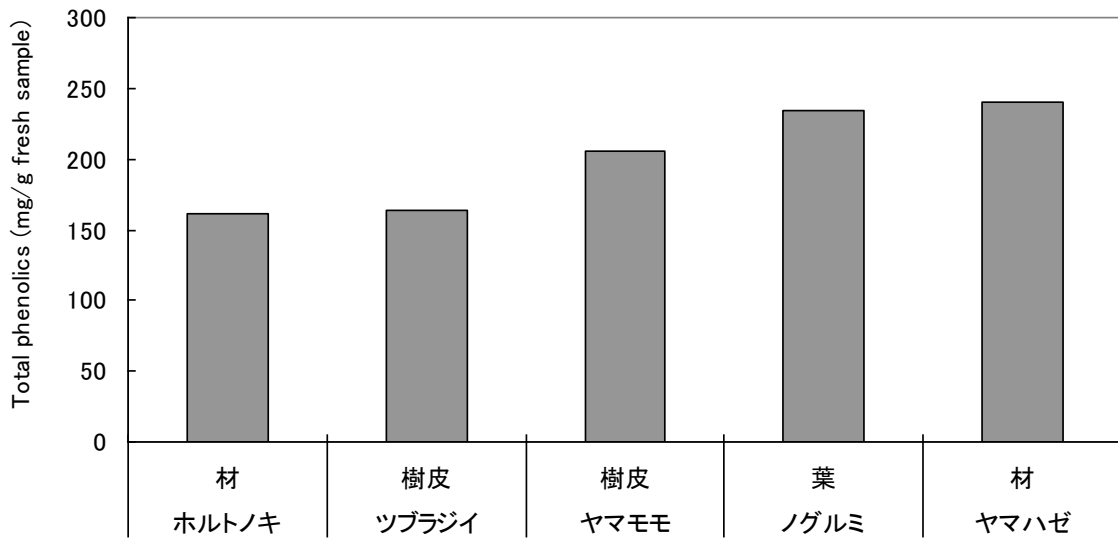


Fig. 2 総ポリフェノール含量 100 mg/g 以上のサンプル

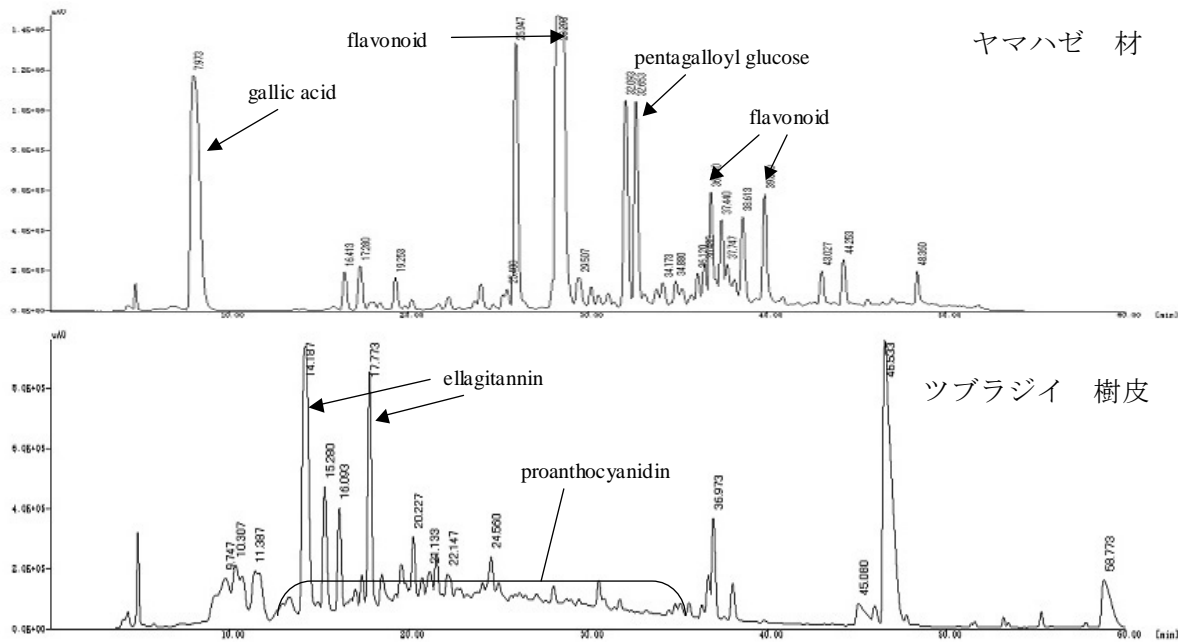


Fig. 3 ヤマハゼの材およびツブラジイの樹皮の HPLC 分析

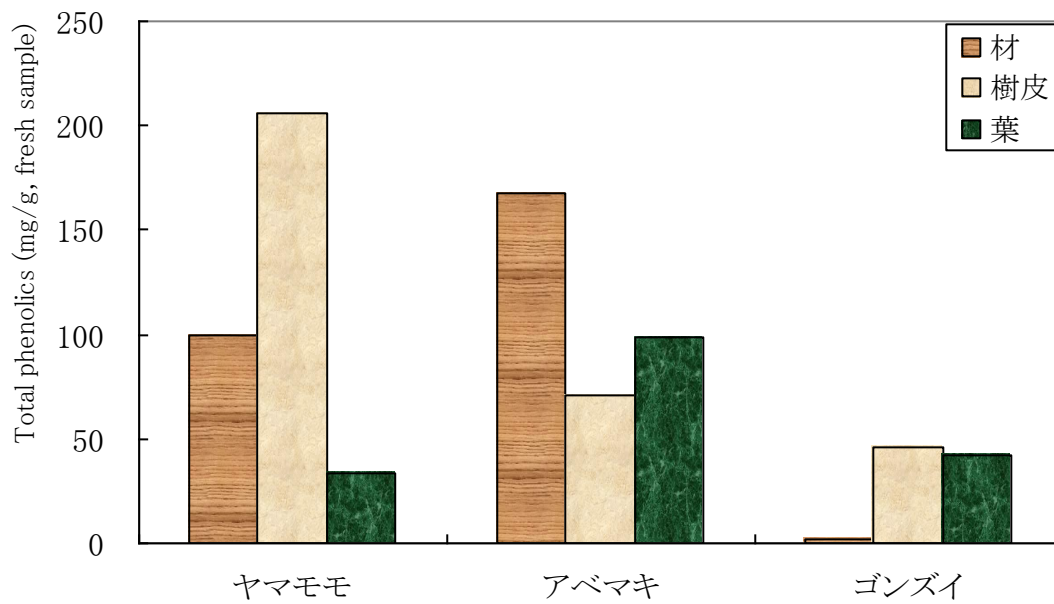


Fig. 4 組織部位による総ポリフェノール含量の差異

### 第3章 香木ノグルミの含有成分および熱処理時の成分変化<sup>15)</sup>

#### 1 ノグルミについて

ノグルミ (*Platycarya strobilacea*, クルミ科) は, 漢名を化香樹 (カコウジュ), 花龍樹 (カリョウジュ), 栲香 (コウコウ), 山麻柳 (サンマリユウ) などとされ, 古くから香りの良い木とされてきた. 最も古い記録としては, 李時珍が 1578 年にまとめ 1596 年に上梓された「本草綱目」に「懷香」としてノグルミのことが記載されている<sup>16)</sup>. 次いで 1709 年に編纂された「大和本草」には『木ヲ焼ケバ香ヨシ・・・沈香ニ代フ』とされ, 線香に用いられる沈香の代替となることが記されており<sup>17)</sup>, 1903 年に編纂された「大日本有用樹木効用編」には『老材は之を焼けば香気を発する』と記されている<sup>18)</sup>. また 1985 年にまとめられた「有用広葉樹の知識」では, 『老木を焼くと香気を発するので化香樹の呼び名がある』と記載されている<sup>19)</sup>. このようにノグルミは, 焼くことにより香りを発する香木として利用されてきた.

長崎県対馬市ではノグルミやコナラ, アベマキが広く自生しており, シイタケ栽培用の原木として利用されている. しかし, ノグルミより多く自生しているコナラやアベマキの方がシイタケ栽培に適しているため, ノグルミの利用頻度は低い. また, 現在, 香木としては全く利用されていない.

ノグルミの材 (以下, ノグルミ材) は, 多量のポリフェノールの他にウイスキーやワインの香り成分として知られるウイスキーラクトンの前駆体を有しており, その含有量はウイスキーの樽として用いられているオーク材よりもはるかに多いことが報告されている<sup>20)</sup>. しかし, 熱処理した時の含有成分の変化や香り成分についての化学的研究はこれまで報告されていない. 前章で述べたようにノグルミ材に特有の脂溶性成分の存在が示唆され, そ

れが香りに関連している可能性もある. そこで, それらを分離するとともにノグルミ材を熱処理する前後での成分変化について検討した.

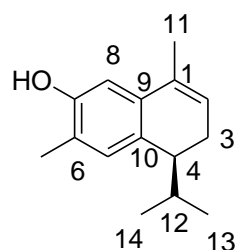
#### 2 ノグルミ材に含まれる揮発性成分の探索

##### 1) 抽出と分離

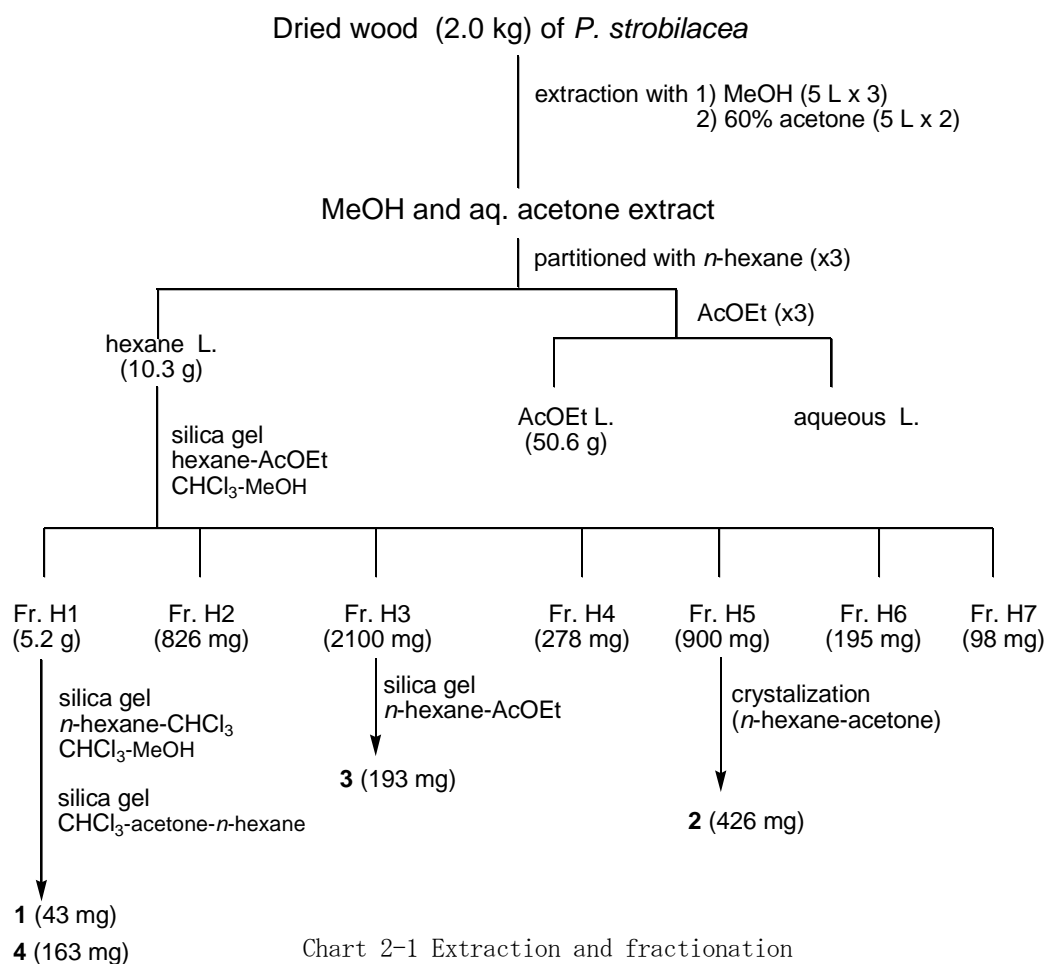
ノグルミ材の乾燥チップ 2.0 kg を MeOH, 次いで 60%含水アセトンで抽出した. 得られたエキスは合わせて濃縮後, ヘキサン, 酢酸エチルで順次溶媒分配し, ヘキサン可溶部と酢酸エチル可溶部を得た. ヘキサン可溶部はシリカゲルクロマト (*n*-hexane-AcOEt) で Fr. H-1~H-7 に分画した (Chart 2-1). さらに繰り返し分離・精製して, 4種の化合物を単離した.

##### 2) 既知化合物の同定

ヘキサン可溶部から分離した4種の化合物のうち1種は, <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを比較することによりセスキテルペンの 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin (**1**)<sup>21,22)</sup> と同定した. この化合物 **1** は, メキシコの薬用植物である *Heterotheca inuloides* から単離され, 抗酸化作用<sup>23)</sup> や抗侵害受容作用による鎮痛作用<sup>24)</sup> が報告されている.



7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin (**1**)

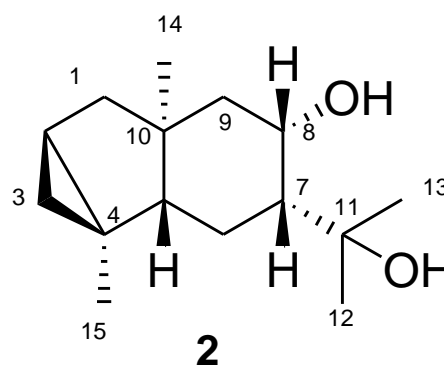


### 3) 新規化合物の構造解析

#### (i) 8,11-Dihydroxy-2,4-cycloeudesmane (2)

化合物 **2** は無色針状結晶として得られ、高分解能 EI-MS の結果より分子式は C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> であることが分かった。<sup>13</sup>C-NMR では計 15 本の脂肪族炭素由来のシグナルが観察されたことから (Table 3), この化合物がセスキテルペンであることが示唆され、 $\delta$  69.2 と  $\delta$  73.2 には水酸基の付け根と思われる炭素が観察された。また、赤外吸収スペクトルでは 3302 cm<sup>-1</sup> に水酸基の吸収を示した。さらに <sup>1</sup>H-NMR スペクトルでは、4つのシングレットメチルシグナルと1つのアルコールの付け根のメチンプロトン由来のシグナル [ $\delta$  4.62 (1H, q,  $J$  = 3.0 Hz, H-8)] が観察された。さらに、 $\delta$  0.54 (1H, t,  $J$  = 3.9 Hz, H-3) と  $\delta$  0.99 (1H, dd,  $J$  = 3.9, 8.2 Hz, H-3') に特徴的なメチレンプロトンシグナルが観察され、そのジェミナルカップリングが

3.9 Hz であることから3員環が存在すると考えられた。3員環の存在は IR スペクトルにおける 3042 cm<sup>-1</sup> の吸収からも支持された。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトルでは、Fig. 5 の太線で示す部分の構造が示唆された。次に、HMOC スペクトルより各水素とその



付け根の炭素のつながりを明らかとした。

さらに、HMBC スペクトルでは Me-12, Me-13 から C-11, C-7 への相関が認められたことからヒドロキシイソプロピル基が C-7 に結合していることが分かった。また、Me-14 から C-1, 9, 10 への相関はこの Me-14 が C-10 に結合していることを示し、Me-15 から C-3, 4, 5 への相関は、Me-15 基が C-4 に結合していることを示していた。これによって、この化合物 **2** が eudesmane 型の平面構造をもつ 8, 11-dihydroxy-2, 4-cycloeudesmane であることが示された。

次に、立体構造を明らかにするため、NOESY スペクトルを測定した。まず Me-14 と Me-15 の 2 つのメチル基の間に NOE が観察され、また、5 位の橋頭メチン水素と 3 員環メチレン水素との間に NOE が認められた。これにより、A 環部分の配置は Fig. 6 に示すような相対配置と考えられた。また、橋頭メチン水素はヒドロキシイソプロピル基の付け根の 7 位メチン水素と相関しており、さらにその 7 位の水素は水酸基の付け根の 8 位のメチン水素と相関していた。8 位の水素はカップリング定数が小さいことからエクアトリアル配向していることは明らかであるので、B 環部分は Fig. 6 に示したような配置となる。以上の検討から、この化合物の相対配置は Me-14, Me-15, イソプロピル基および C-8 水酸基がいずれも  $\alpha$  配向の 8, 11-dihydroxy-2, 4-cycloeudesmane であると決定した (Fig. 6)。この化合物の絶対配置については後述する。

Table 3  $^1\text{H}$ - (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ - (125 MHz) NMR data for compound **2** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

<b>2</b>		
Position	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
1	0.86 (br dd, 3.4, 12.0)	45.7
	1.84 (dd, 6.6, 12.0)	
2	1.23 (m)	26.3
3	0.54 (t, 3.9)	33.6
	0.99 (dd, 3.9, 8.2)	
4		27.1
5	1.05 (dd, 3.0, 13.0)	56.8
6	2.06 (dt, 13.0, 3.0)	19.3
	2.16 (q, 13.0)	
7	1.33 (dt, 13.0, 3.0)	51.1
8	4.62 (dt, 3.0, 3.0)	69.2
9	1.36 (dd, 3.0, 14.2)	45.2
	2.06 (dd, 3.0, 14.2)	
10		50.9
11		73.2
12	1.50 (s)	29.1
13	1.62 (s)	28.8
14	1.51 (s)	21.7
15	1.22 (s)	18.7

<sup>a</sup> Measured in  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , <sup>b</sup> measured in  $\text{CDCl}_3$ .

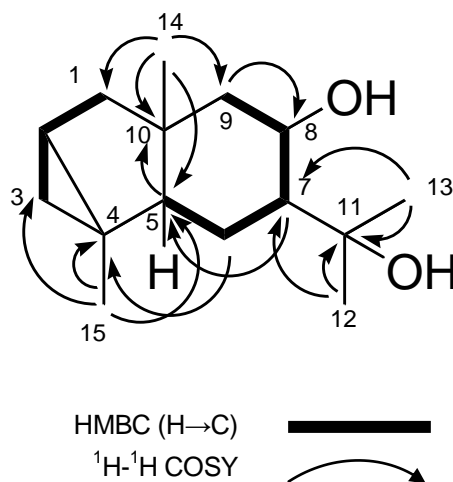
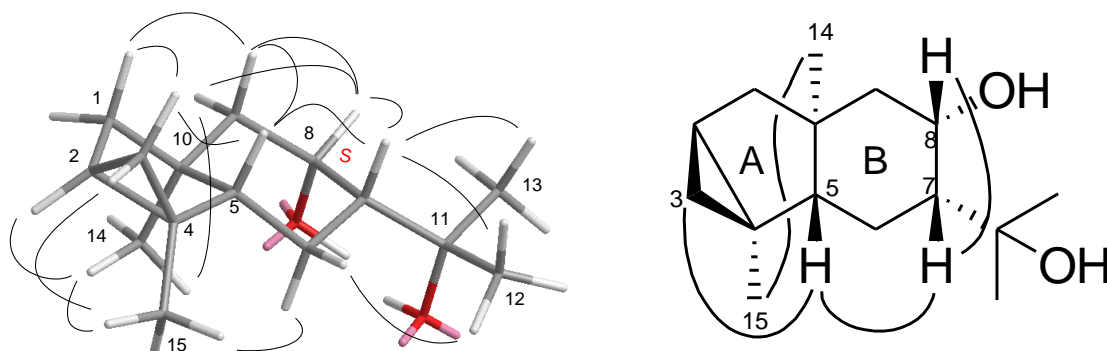
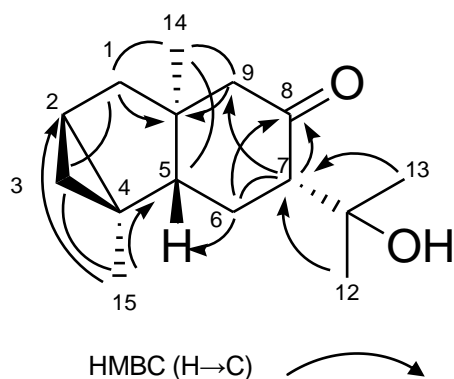
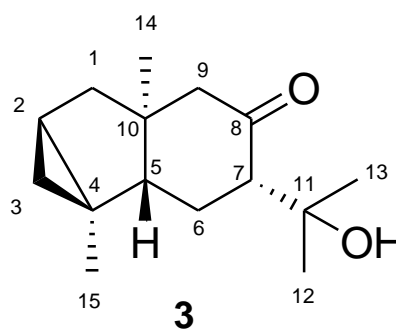


Fig. 5  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations for **2**

Fig. 6 Important NOESY correlations for **2**(ii) 11-Hydroxy-2,4-cycloedesmane-8-one (**3**)

化合物 **3** は油状物質で、その高分解能 EI-MS の結果より分子式は前述の化合物 **2** より水素が2つ少ない  $C_{15}H_{24}O_2$  であることが分かった。 $^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトル (Table 4) はいずれも化合物 **2** と類似していたが、 $^{13}C$ -NMR では **2** のスペクトルで観察された8位の  $\delta$  73.2 の二級アルコールのシグナルが認められない代わりに  $\delta$  215.4 にカルボニル炭素のシグナルが観察され、このカルボニルの存在は IR スペクトルの  $1688\text{ cm}^{-1}$  の吸収からも確認された。したがって、この化合物は **2** の8位が酸化された化合物と推定された。さらに HMBC スペクトルを解析し Fig. 7 に示すような相関が示された。特に H-6 および H-7 から C-8、さらに H-7 から C-9 への相関がみられたことから、予想通り化合物 **3** の構造は化合物 **2** の8位がケトンとなっていることが分かり、11-hydroxy-2,4-cycloedesmane-8-one であると結論した。

Fig. 7 HMBC correlations for **3**Table 4  $^1H$ - (500 MHz),  $^{13}C$ - (125 MHz) NMR data for compound **3** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

<b>3</b>		
Position	$^1H^a$	$^{13}C^b$
1	0.98 (br d, 4.0, 12.7)	43.9
	1.76 (dd, 6.8, 12.7)	
2	1.20 (m)	26.8
3	0.44 (t, 4.4)	33.5
	0.92 (dd, 4.4, 8.3)	
4		26.0
5	1.52 (m)	54.0
6	2.13 (m)	25.2 <sup>c</sup>
	2.23 (m)	
7	2.21 (m)	58.8
8		215.4
9	2.18 (d, 13.2)	54.8
	2.25 (d, 13.2)	
10		54.3
11		71.9
12	1.25 (s)	28.6
13	1.20 (s)	25.2 <sup>c</sup>
14	0.88 (s)	20.2
15	1.11 (s)	18.9

<sup>a</sup> Measured in  $C_5D_5N$ , <sup>b</sup> measured in  $CDCl_3$ ,<sup>c</sup> Assignments may be interchanged.

## (iii) 2,4-Cyclo-7(11)-eudesmen-8-one (4)

化合物 **4** は油状物質で、ヘキサン可溶部のセスキテルペンの中で最も量が多く、その分子式は高分解能 EI-MS の結果から、化合物 **3** よりさらに水分子 1 個分少ない  $C_{15}H_{22}O$  であることが分かった。IR スペクトルは水酸基の吸収を示さず、 $1673\text{ cm}^{-1}$  にカルボニル、 $1590\text{ cm}^{-1}$  に C=C 二重結合の吸収を示し、UV スペクトルでは 251 nm に共役ケトンの存在を示す吸収が観察された。

さらに  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Table 5) では、 $\delta$  203.6 に共役ケトン、 $\delta$  130.5 と  $\delta$  146.3 に二重結合のシグナルが観察され、このことから化合物 **4** は化合物 **3** の C-11 の水酸基が脱水して生成した化合物と考えられた。その他の NMR スペクトルは化合物 **2** および **3** のものと類似しており、同じ骨格をもつ化合物であることが分かった。すなわち、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルでは、H-1 から H-3 へのつながりと H-5 から H-6 へのつながりが分かった。また、H-6 から H-13 へ長距離相関がみられたので二重結合に隣接していることが示された。さらに Fig. 8 に示したような C-8 から H-6, H-9, および H-12 への HMBC 相関が観察されたことから、化合物 **4** の構造は 2,4-cyclo-7(11)-eudesmen-8-one と決定した。

化合物 **2**, **3** および **4** などの eudesmane 型セスキテルペンはクスノキ科などの樹木の成分として単離される例はあり、A 環側にシクロプロパンを持った化合物も少なくないが、このように 2,4-cyclo 型のセスキテルペンが報告された例は 4 例しかなく<sup>25-28)</sup>、自然界では珍しい化合物である。

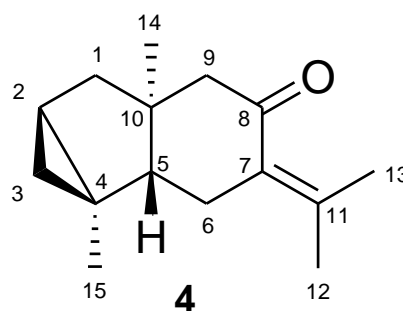
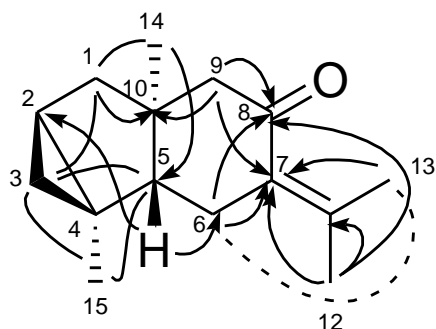


Table 5  $^1\text{H}$ - (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ - (125 MHz) NMR data for compound **4** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

4		
Position	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
1	0.95 (br dd, 3.2, 12.7) 1.82 (dd, 6.8, 12.7)	44.6
2	1.21 (dddd, 3.2, 4.0, 6.8, 8.3)	26.8
3	0.39 (t, 4.0) 0.91 (dd, 4.0, 8.3)	33.4
4		26.4
5	1.42 (dd, 5.2, 14.2)	52.2
6	2.28 (dddd, 0.9, 2.1, 14.2, 15.1) 2.71 (ddd, 0.7, 5.2, 15.1)	27.0
7		130.5
8		203.6
9	2.18 (br d, 15.9) 2.31 (d, 15.9)	54.2
10		52.1
11		146.3
12	1.83 (d, 0.9)	23.1
13	2.01 (dd, 0.7, 2.1)	23.6
14	1.00 (d, 0.9)	20.6
15	1.17 (s)	19.1

<sup>a</sup> Measured in  $C_5D_5N$ , <sup>b</sup> measured in  $CDCl_3$ .



HMBC (H→C)  
Long range  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  coupling



Fig. 8 HMBC correlations and long range  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  coupling for **4**



### (1) 化合物 2, 3, 4 の絶対配置について

絶対配置については、化合物 **2** への新 Mosher 法<sup>29)</sup>の適用を試みたが、隣接位に大きい置換基をもつアキシャル水酸基であるため MTPA ( $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -(Trifluoromethyl) Phenylacetic Acid)エステルへ誘導することが出来なかった。そこで、CD スペクトルの検討により推定した。

まず、化合物 **4** の CD スペクトルにおいて 320 nm に負の Cotton, 243 nm に正の Cotton 効果が観察された。この特徴は Fig. 9 に示すような類似構造をもつ *cisoid-enone* 類の CD スペクトルのものと一致しており<sup>30-32)</sup>、このことから **4** の

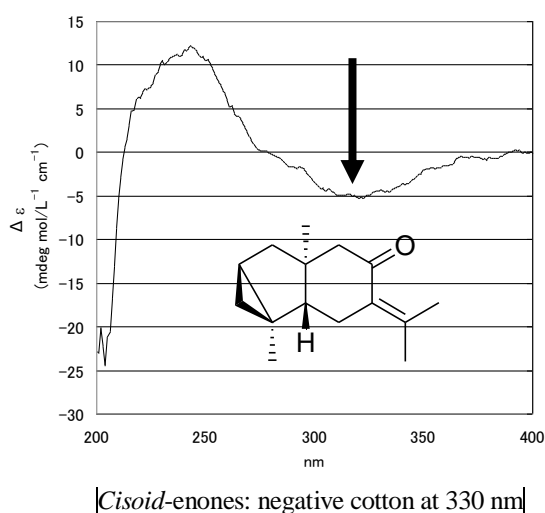


Fig. 9 CD Spectrum (in EtOH,  $9.72 \times 10^{-5}$  mol/L) and absolute configuration of **4**

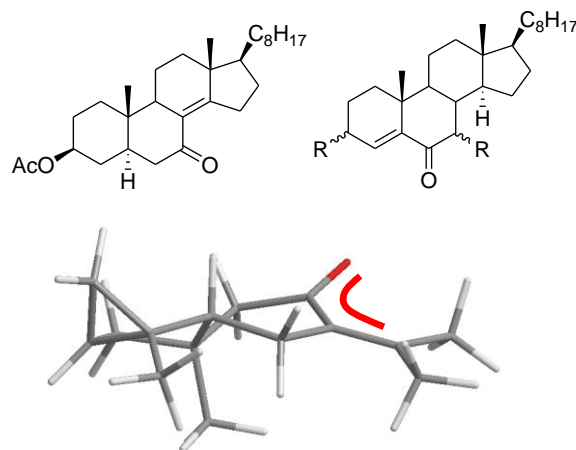
### (2) ノグلمي材の加熱時における揮発性成分

ノグلمي材は加熱すると芳香を発するため、香木として利用されていた。そこで、この芳香成分の中に化合物 **1** ~ **4** が含まれるかどうか検討した。まず、ノグلمي材をステンレス製のオープンで加熱し、生じる煙をアスピレータで吸引した。煙に含まれる成分は、オープンとアスピレータの間に設置したクロロホルムにトラップした。そのクロロホルム溶液について TLC および HPLC 分析を行った結果、化合物 **4** が存在したが、**1**, **2**, **3** は検出できなかった。

ノグلمي材には oak lactone precursor (**5**)が

*cisoid-enone* のねじれはステロール類のものと同じ 10-*S* 配置と推定した。したがって **4** の絶対配置は Fig. 9 に示すように決定した。

次に、化合物 **2** について  $K_2Cr_2O_7$  による水酸基の酸化反応を行った結果、8 位の水酸基が酸化され、化合物 **3** が生成した。また、化合物 **3** については、酸性条件下で 11 位の水酸基が脱水されて化合物 **4** が生成した。**2** および **3** から生成した **4** の比旋光度は天然から得た **4** のものと一致した。したがって、今回得られた化合物 **2**, **3** の絶対構造は、化合物 **4** と同じであることが明らかとなった。



高濃度で含有されているにもかかわらず、熱処理後の材から得たヘキサン可溶部には oak lactone ( $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone) は検出されなかった。一方、TLC 分析の結果から、化合物 **1** ~ **4** の存在は確認できたが、熱処理前より熱処理後の方が **4** の濃度が高くなっていた。これは、熱処理によって **3** が脱水反応を起こし、**4** が生成したためと考えられる。

セスキテルペン類は木材の香り (woody note) を有することから香料として活用されている<sup>33)</sup>が、化合物 **4** の香りも木材特有の香りであり、ノグلمي材の芳香を特徴づける成分であると考えられる。

### 3 ノグelm材の熱処理前後の成分変化

#### 1) はじめに

ノグelm材は焼くことによって香木として利用されてきた。ノグelm材のポリフェノール成分についてはすでに検討されているが、熱処理による成分変化については検討されていない。そこで、熱処理前後の成分変化について検討するため、以下に示す検討を行った。

#### 2) 抽出と分離

熱処理前の抽出エキスは、前節 2.2 で得たものを使用した。熱処理後の試料については、まず、ノグelm材の表面をバーナーで焼いた後、粉砕したものを使用した。その試料 (2 kg) を MeOH、次いで 60%含水アセトンで抽出し、エキスを合わせ

て濃縮したあと水溶液とし、ヘキサン、酢酸エチルで順次溶媒分配して、ヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部を得た。

熱処理前後の各フラクションを HPLC で比較した際、多くの差異が認められた酢酸エチル可溶部について、詳細に検討することとした。また、熱処理後の酢酸エチル可溶部は最も芳香が強いフラクションであった。

熱処理前および熱処理後 (Chart 2-2) の酢酸エチル可溶部は、それぞれ Sephadex LH-20, MCI gel CHP20P, Diaion HP20SS, Chromatorex ODS, silica gel などのクロマトグラフィーを繰り返して分離し、前節 2.2 で得たものと合わせ、2 種の新規化合物を含む 19 種の化合物を分離した。

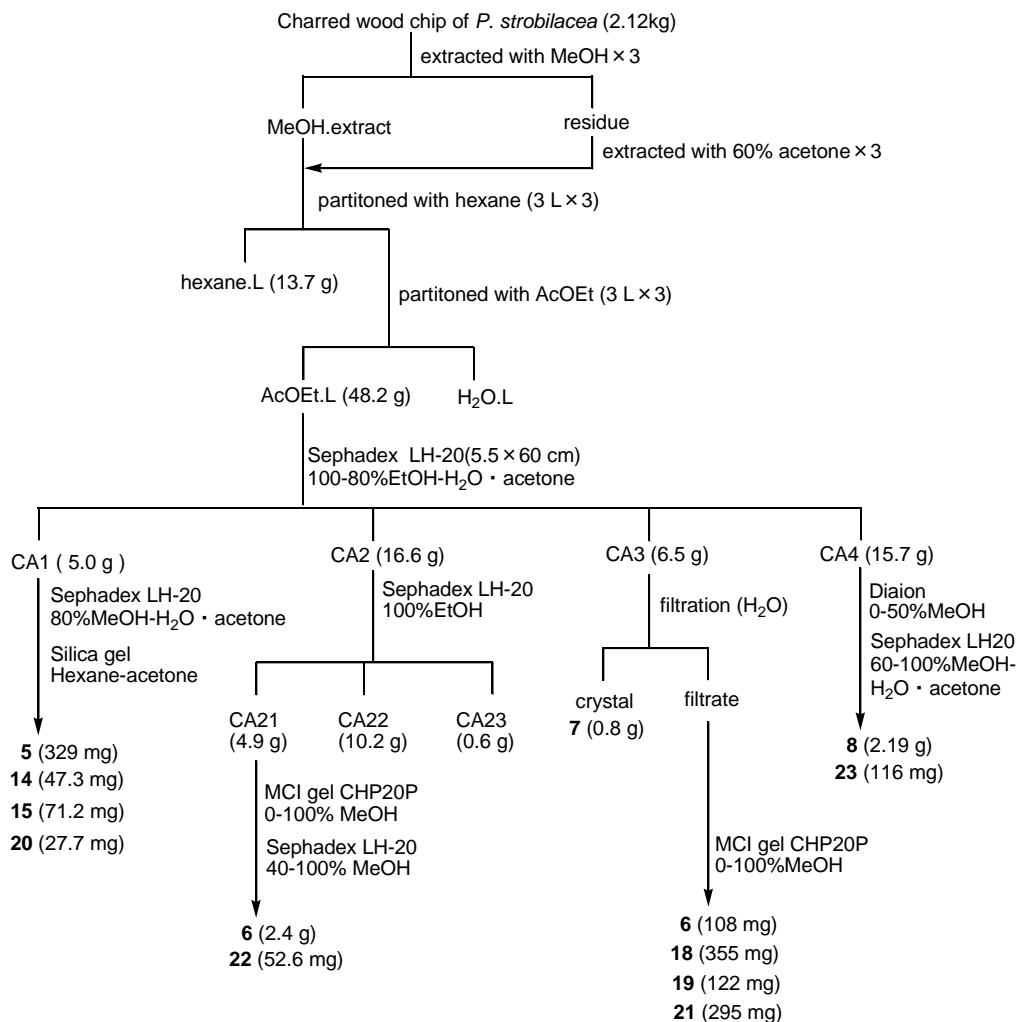


Chart 2-2 Extraction and fractionation of charred wood constituents

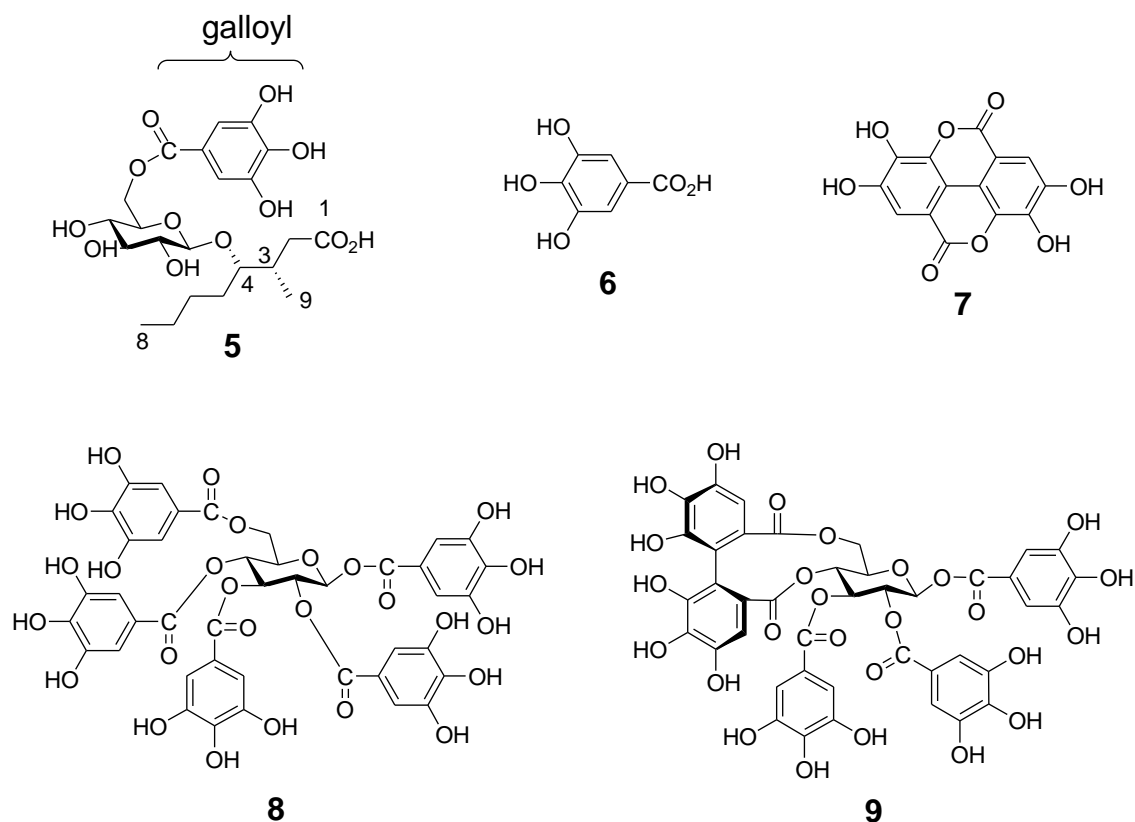
### 3) 既知化合物の同定

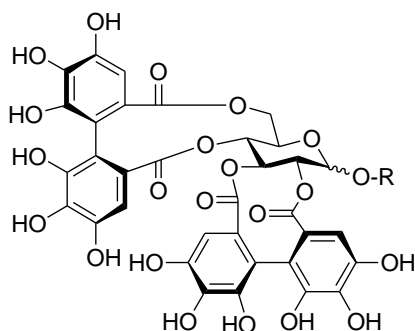
酢酸エチル可溶部のエキスから分離した 17 種の既知化合物は、<sup>1</sup>H-および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを標品または文献値と比較することにより、次のように同定した。

熱処理前の酢酸エチル可溶部からは、oak lactone precursor (**5**)<sup>20</sup>, gallic acid (**6**), ellagic acid (**7**), 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl-β-D-glucose (**8**)<sup>34</sup>, eugenin (**9**)<sup>35</sup>, pedunculagin (**10**)<sup>36</sup>,

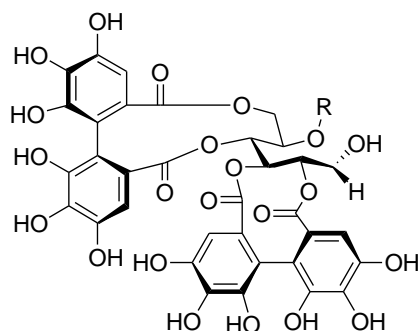
1(β)-*O*-galloyl pedunculagin (**11**)<sup>37-39</sup>, casuariin (**12**), casuarinin (**13**)<sup>40</sup>を得た。

熱処理後の酢酸エチル可溶部からは coniferylaldehyde (**14**), sinapylaldehyde (**15**), quercetin 3-*O*-rhamnoside (**18**), myricetin 3-*O*-rhamnoside (**19**), (-)-episingaresinol (**20**)<sup>41</sup>, *m*-および *p*-digallic acid (**21**)<sup>34</sup>を得た。また、vanillin (**16**)および syringaldehyde (**17**)は HPLC 分析で UV 吸収と保持時間を標品と比較して決定した。

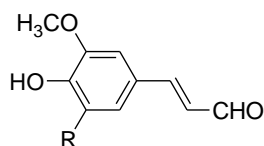




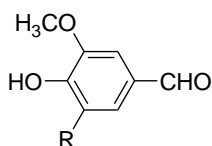
**10** : R = H  
**11** : R = β-galloyl



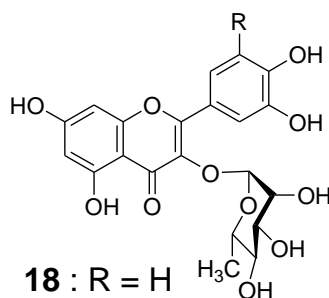
**12** : R = H  
**13** : R = galloyl



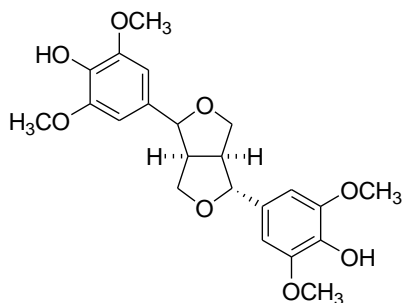
**14** : R = H  
**15** : R = OCH<sub>3</sub>



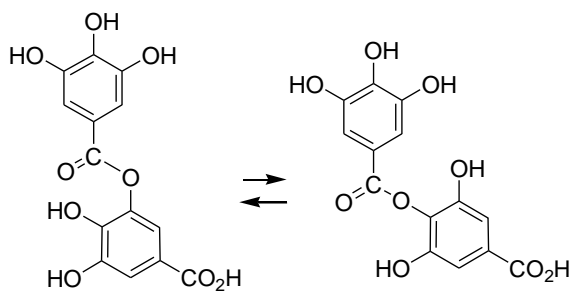
**16** : R = H  
**17** : R = OCH<sub>3</sub>



**18** : R = H  
**19** : R = OH



**20**



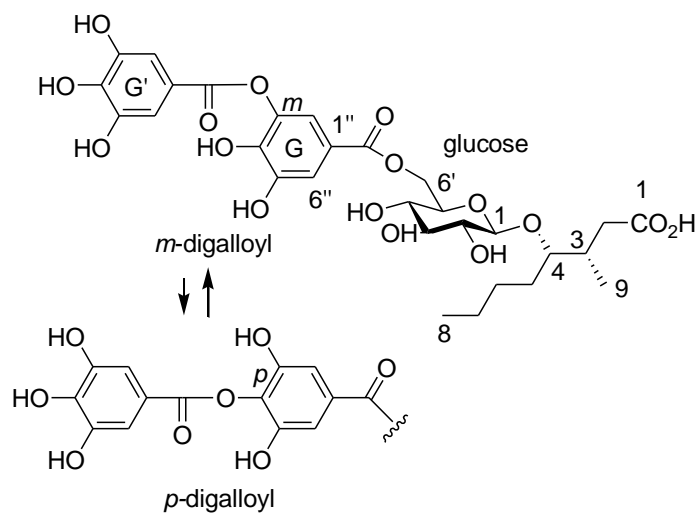
**21**

#### 4) 新規化合物の構造解析

##### (i) 6'-*O*-Digalloyl oak lactone precursor (**22**)

化合物**22**の<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-NMRスペクトルはoak lactone precursor (**5**)および*m*-および*p*-digallic acid (**21**)のものと類似しており、特にグルコースとアグリコン部分のシグナルはほとんど同じ位置に観察された (Table 6)。しかし、ガロイル基由来のシグナルが1個多く認められ、一方のガロイル基のシグナルは互いにメタカップリングしており、非等価になっていることが分かった。このことは、グルコースの6位に結合したガロイル基の3位のフェノール水酸基に新たにガロイル基がエステル結合していることを示唆して

いた。また、高分解能MSの結果から分子量は663であることが示され、このことも先の推定を支持した。さらに、化合物**22**を酵素加水分解した結果、(3*S*,4*S*)-3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid 4-*O*-β-D-glucopyranosideとgallic acid (**6**)が得られたことからこの構造が支持された<sup>20</sup>。なお、マイナー成分としてガロイル基の4位にガロイル基が結合した異性体の存在も示唆されたが、これは隣接する水酸基上でのアシル転位が起こって生成した異性体と推定された。したがって、化合物**22**は6'-*O*-*p*- and *m*-digalloyl-(3*S*,4*S*)-3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid 4-*O*-β-D-glucopyranosideであると結論づけた。

Table 6  $^1\text{H}$ - (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ - (100 MHz) NMR data for compound **22** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

position	<i>m</i> -digalloyl isomer		<i>p</i> -galloyl isomer	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1		175.2		175.2
2	2.59 (dd, 12, 5) 2.21-2.12 (m)	37.3	2.59 (dd, 12, 5) 2.21-2.12 (m)	37.3
3	2.21-2.12 (m)	34.1	2.21-2.12 (m)	34.1
4	3.60 (m)	83.0	3.60 (m)	83.0
5	1.5-1.1 (m)	31.5	1.5-1.1 (m)	31.5
6	1.5-1.1 (m)	28.6	1.5-1.1 (m)	28.6
7	1.5-1.1 (m)	23.1	1.5-1.1 (m)	23.1
8	0.74 (t, 7)	14.3	0.74 (t, 7)	14.3
9	0.89 (d, 7)	15.1	0.89 (d, 7)	15.1
glc-1'	4.39 (d, 7)	103.9	4.39 (d, 7)	103.9
glc-2'	3.22-3.18 (m)	74.7	3.22-3.18 (m)	74.7
glc-3'	3.46-3.40 (m)	78.0	3.46-3.40 (m)	78.0
glc-4'	3.46-3.40 (m)	71.6	3.46-3.40 (m)	71.6
glc-5'	3.60 (m)	75.2	3.60 (m)	75.2
glc-6'	4.60 (dd, 10, 2) 4.35 (dd, 12, 7)	65.0	4.60 (dd, 10, 2) 4.35 (dd, 12, 7)	65.0
1''		120.7, 121.8		129.0
2''	7.48, 7.37 (d, 2)	117.4	7.25, 7.21 (s)	109.9
3''		143.5		151.3
4''		139.5, 139.8		132.4
5''		151.3		151.3
6''	7.48, 7.37 (d, 2)	114.6	7.25, 7.21 (s)	109.9
1'''		120.7		120.7, 121.8
2'''	7.26 (s)	109.9, 110.6	7.25, 7.21 (s)	109.9, 110.6
3'''		146.1, 146.2		146.1, 146.2
4'''		139.5, 139.8		139.5, 139.8
5'''		146.1, 146.2		146.1, 146.2
6'''	7.26 (s)	109.9, 110.6	7.25, 7.21 (s)	109.9, 110.6

Measured in acetone- $d_6$ ; *meta*-isomer: *para*-isomer = 1.00 : 0.38

(ii) **3-*O*-Methylellagic acid 4'-*O*-(4''-*O*-galloyl)-xylopyranoside (23)**

化合物 **23** は白色無晶形粉末であり, その  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは,  $\delta$  7.07 の 2H 分のシングレットのシグナルから, 芳香環上の 2 つの対称な水素の存在が判明し, ガロイル基の存在が示唆された. また,  $\delta$  3.5 ~ 4.3 には 4 つのメチンと 1 つのメチレンからなる糖由来のシグナルが認められ, その結合定数がいずれも大きい ( $J=7 \sim 9$  Hz) ことから xylose の存在も判明した. さらに,  $\delta$  7.22 および  $\delta$  7.39 の低磁場に観察される芳香族水素のシグナルは ellagic acid (**7**) のものと類似した.

一方,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルでは, 全部で 25 本のシグナルが見られたが, ガロイル基の対称構造を考慮すると, 27 個の炭素があると考えられた. ガロイル基と xylose 以外には, 2 つのほぼ等価なカルボニル炭素, 1 つのメトキシ基, そして 12 個の芳香族炭素が認められた. 2 つのカルボニル炭素は  $\delta$  160 付近に認められ, エステルとしては異常に高磁場側にシフトしている. これはエラグ酸のラクトンカルボニルのものとよく類似しており,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -不飽和ラクトンの存在を示していた.

次に, HSQC スペクトルから, 各水素の結合している炭素を特定した. HMBC スペクトル (Fig. 10) では, H-5 と H-5' の相関から, 水酸基, カルボニル基の位置を決定した. メトキシ基の水素は, C-3 に相関を示していたので, メトキシ基は 3 位に結合しているということも決定できた. ガロイル基の 2 つの水素と, xylose の 4 位の水素が, ともにガロイル基のカルボニル基と相関を示していたため, ガロイル基はキシロースの 4 位にエステル結合していると考えられた. 最後に, キシロースの 1 位の水素は, エラグ酸ユニットの 4' 位の炭素に相関を示していたので, キシロースは 4' 位に結合していると決定した. 次に, **23** を tannase によって加水分解したところ, gallic acid と既知化合物の 3-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-xyloside が得られた<sup>42)</sup>. キシロースの絶対構造の決定は, チオカルバモイル-チアゾリジン誘導体法により行った<sup>43)</sup>. まず, **23** を 0.05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  に溶解し, 100 °C で 5 時間処理した. Amberlite IRA400 を加え中和

した後, ろ過して樹脂を除いた. ろ液は乾燥後, L-cysteine methyl ester の pyridine 溶液を加え, 60 °C で 1 時間加熱した. さらに, *o*-tolyl isothiocyanate の pyridine 溶液を加え, 60 °C で 1 時間加熱した. 反応液を HPLC 分析した結果, D-xylose と決定した (Chart 2-3).

以上のことから化合物 **23** の構造は Fig. 10 のように結論した.

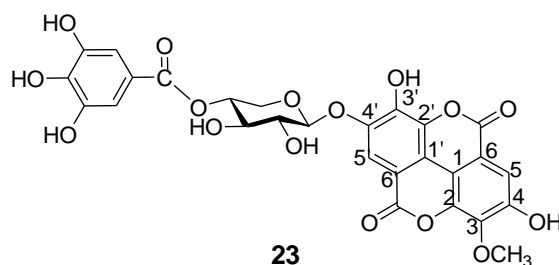


Table 7  $^1\text{H}$ - (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ - (100 MHz) NMR data for compound **23** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1		112.1
2		142.0
3		141.3
4		153.6
5	7.22 (1H, s)	112.8
6		113.7
7		160.1
OCH <sub>3</sub>	4.12 (3H, s)	62.0
1'		115.7
2'		136.8
3'		142.4
4'		148.0
5'	7.39 (1H, s)	113.2
6'		108.1
7'		160.1
xyI-1''	5.00 (1H, d, 7.3)	104.0
xyI-2''	3.69 (1H, dd, 9.0, 7.3)	74.6
xyI-3''	3.92 (1H, t, 9.0)	74.4
xyI-4''	5.03 (1H, m)	72.8
xyI-5''	4.24 (1H, dd, 11.0, 5.3)	64.0
	3.62 (1H, dd, 11.0, 10.0)	
G-1'''		120.9
G-2'''	7.07 (2H, s)	110.3
G-3'''		146.4
G-4'''		140.0
G-7'''		167.7

Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$

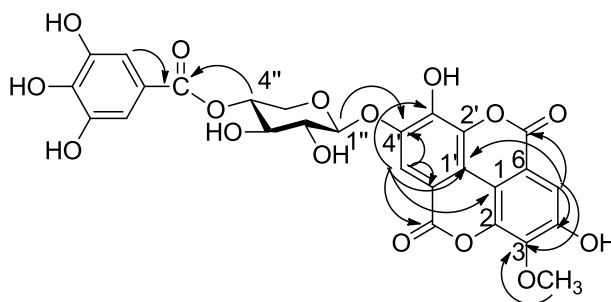


Fig. 10 Important HMBC correlations for **23**

### 5) 熱処理前後の成分変化

ノグレミは材を燃やすことによって香木として利用されたことから、熱処理を行ったときの成分変化について検討した。先に述べたようにヘキサン可溶部に含まれていたテルペノイドについては、化合物**4**が煙の中に含まれていることを確認した。ここでは、最も芳香が強かった酢酸エチル可溶部について、成分を精査した。

熱処理後の材の酢酸エチル可溶部には、HPLC分析の結果、熱処理前のものと比較していくつかのピークが新たに出現した (Fig. 11)。新たに出現した大きなピークは、18.0 min と 20.3 min に認められ、それらは *m*-および *p*-digallic acid (**21**) の平衡混合物であった。**21** の生成機構は、ガロイル基のアシル転位か、gallic acid (**6**) が脱水して二量体化したものと考えられる。また、1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloylglucose (**8**) あるいは**6**を 200 °Cで 30 min 加熱すると**21**が生成することを確認した。しかし、熱処理前の材に含まれていた**21**の未知のエステルが加水分解することで

も**21**の生成が可能である。HPLCプロファイルのその他の差異は、エラジタンニン類の pedunculagin (**10**), 1( $\beta$ )-*O*-galloyl pedunculagin (**11**), casuariin (**12**) および casuarinin (**13**) が極端に減少している点である。おそらく、この現象はエラジタンニン類がラジカル酸化されやすいためだと考えられる<sup>44</sup>。エラジタンニン類からの生成物については不明であるが, ellagic acid (**7**) のピーク面積は増加していないため、エラジタンニンの分解は関与していないと推定される。

さらに量的には少ないが, coniferylaldehyde (**14**), sinapylaldehyde (**15**), vanillin (**16**), syringaldehyde (**17**) および (-)-episyringaresinol (**20**) が得られた。これらの化合物は、リグニンの分解生成物であり, vanillin の甘い香りは熱処理した材の特徴的な香りである<sup>45</sup>。加えて, quercetin 3-*O*-rhamnoside (**18**) および myricetin 3-*O*-rhamnoside (**19**) も単離された。

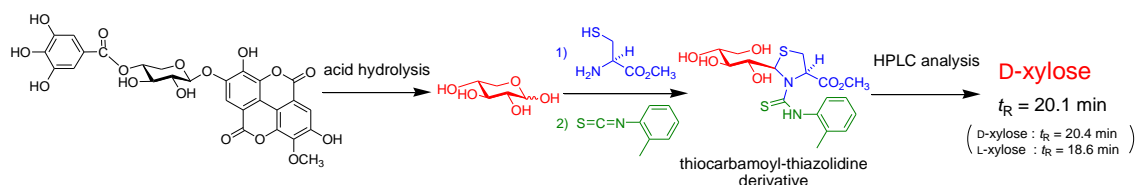


Chart 2-3 Determination of absolute configuration of sugar moiety

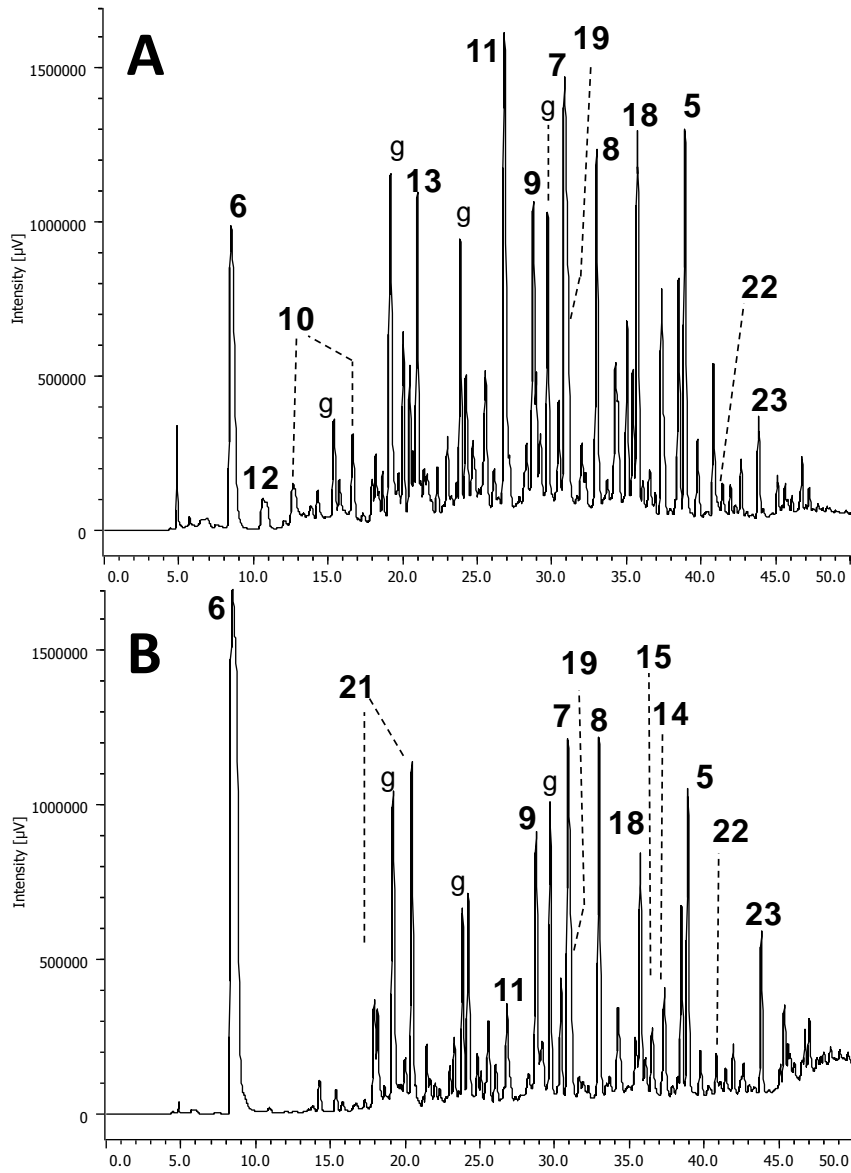


Fig. 11 Reversed-phase HPLC of the AcOEt soluble fraction of *P. strobilacea* wood. **A:** The AcOEt fraction of fresh wood, **B:** The AcOEt fraction of charred wood. g: Unidentified galloyl glucoses.



#### 4 小括

ノグلمي材は、焼くことによって香木として利用されていた。そこでノグلمي材の揮発性成分および熱処理による成分変化について検討した。

これまで精査されていないノグلمي材に含まれる脂溶性成分について分離した結果、3員環構造をもつ3種のeudesmane型のセスキテルペン**2**~**4**が得られ、これらは新規化合物であった。熱処理時の煙をトラップしてこれらセスキテルペンの有無を確認した結果、2,4-cyclo-7(11)-eudesmen-8-one (**4**)だけが存在した。また、ノグلمي材にはウイスキーやワインの芳香成分の前駆体である oak lactone precursor (**5**)が高濃度で含有されているが、熱処理を施しても oak lactone は生成していなかった。化合物**4**は煙の中にも含まれており、木材特有の香りを有することから、ノグلميの香りを特徴づけるものであると考えられる。

熱処理した材では、酢酸エチル可溶部が最も芳香が強かった。その香りの成分はリグニン分解生成物である coniferylaldehyde (**14**) , sinapylaldehyde (**15**) , vanillin (**16**) ,

syringaldehyde (**17**)および

(-)-episyringaresinol (**20**)であり、ノグلمي材を焼いたときの甘い香りはこれらと化合物**4**が関与しているものと考えられる。

熱処理したノグلمي材の酢酸エチル可溶部に含まれるフェノール成分については、gallotannin類に比べ、ellagitannin類が急激に減少することが明らかとなった。また、ellagic acid (**7**)は増加していないので、エラジタンニンの分解が起こっているのではなく、他の分解生成物へと変化しているものと考えられる。

熱処理したノグلمي材の成分について検討した結果、煙の中に含まれるテルペンやポリフェノール類の成分変化、新規化合物**22**と**23**およびリグニン分解産物の生成が明らかになった。ノグلميは香木として利用可能であり、対馬地域に多く自生することから、資源の活用につなげていきたい。

## 第4章 ゴンズイに含まれるフェノール成分<sup>46)</sup>

### 1 ゴンズイについて

ゴンズイ (*Euscaphis japonica* (THUNB.) KANITZ) はミツバウツギ科 (*Staphyleaceae*) の落葉小高木で、本州の関東以西、四国、九州、沖縄に分布している。長崎県内にも自然分布しており、主に道路沿いで日当たりのいい場所に見受けられる。ゴンズイは、木材としての用途の頻度は少なく、沖縄で新芽を食用として利用している程度である<sup>19)</sup>。

第1章で述べたように、ゴンズイの葉と樹皮には多量のポリフェノールの存在が明らかとなった (Fig. 4)。しかし、これまでゴンズイおよびミツバウツギ科植物のポリフェノールに関する報告は全くない。そこで、ゴンズイのポリフェノール成分の抽出・分離を行った。

### 2 葉に含まれるポリフェノール成分

#### 1) 抽出と分離

2007年5月に採集した新鮮葉 500 g を 80% 含水アセトン (1 L) と共に粉碎し、ろ過した。その残渣に 80% 含水アセトン (1 L) を加え、ろ過する工程を 2 回繰り返した。ろ液は合わせて減圧濃縮し、アセトンを留去した。さらに、濃縮液に含まれるクロロフィルや油脂をろ過して取り除いた後、水溶液を Diaion HP20SS カラムクロマトに付し、Fr. 1~3 に分画した (Chart 3-1)。FeCl<sub>3</sub> 試薬により青紫色に呈色した Fr. 2 は、Sephadex LH-20 カラムクロマトに付して分離を繰り返す。最終的に Chromatorex ODS カラムクロマトで精製して、化合物 **11** と **24** を得た。

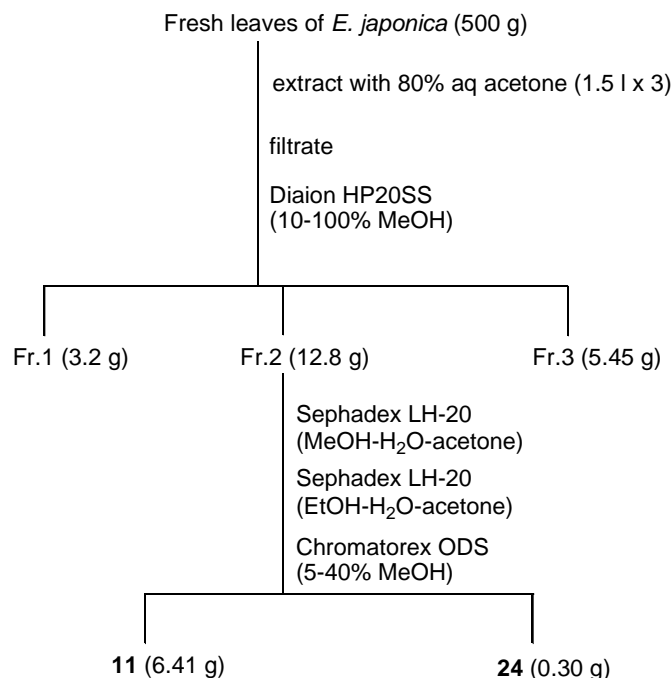
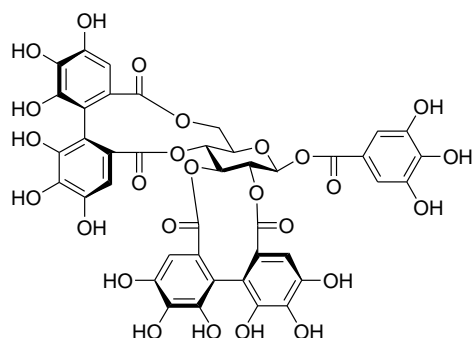


Chart 3-1 Extraction and fractionation

## 2) 既知化合物の同定

エキスから分離したポリフェノールの主成分は、 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを文献値と比較することにより、1( $\beta$ )-*O*-galloyl pedunculagin (**11**)<sup>37-39</sup>と同定した。**11**は、A-kinaseの $\beta$ -regulatory subunitにおける選択的阻害活性<sup>47</sup>とC-kinaseの自己リン酸化阻害活性<sup>48</sup>といったキナーゼ阻害活性すると報告されている。ゴンズイの葉は、化合物**11**を新鮮重量の1.28%と極めて高濃度で含有しており、有力な植物資源として期待できる。

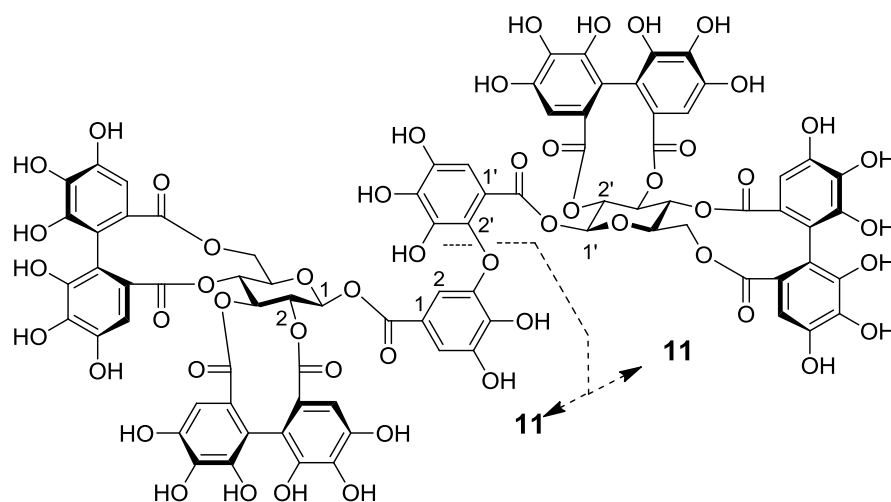


**11**

## 3) 新規化合物の構造解析

化合物**24**は白色無晶形粉末として得られ、 $[\alpha]_D^{30}$  40.5 ( $c=0.2$ , acetone- $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, v/v)を示した。 $\text{FeCl}_3$  試薬により青紫色に、 $\text{NaOH}$ - $\text{AcOH}$  試薬との反応により茶色に呈色する<sup>49</sup>ことからエラジタンニンであることが示唆された。順相シリカゲルを用いた TLC 分

析では、化合物**11**より  $R_f$  値が小さく、MALDI-TOF-MAS では  $m/z$  1893 に  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ピークを示したことから、化合物**24**はエラジタンニン二量体であることが明らかとなった。また、元素分析から分子式は  $\text{C}_{82}\text{H}_{54}\text{O}_{52}$  と決定した。 $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (Table 8) では、糖由来の2つのアノマー水素 [ $\delta$  6.16 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, Glc-1), 6.06 (1H, d,  $J=8.7$  Hz, Glc-1')] に帰属されるシグナルを示し、残りの糖のプロトンシグナルは化合物**11**のものと類似していた。すなわち、糖のシグナルが通常の  $\delta$  3.0~4.5 よりも大きく低磁場側の  $\delta$  3.7~6.2 の範囲に観察されることから、すべての水酸基がエステル化されており、それらの結合定数 ( $J_{1,2}$ ,  $J_{2,3}$ ,  $J_{3,4}$  および  $J_{4,5}$ ) がすべて 8.5~10 Hz と大きな値であることから、ピラノース環上の水素がすべてアキシャル配置であることが分かる。さらに、糖部分の絶対構造については、**24**を酸加水分解後、L-システインメチルエステルおよび  $\sigma$ -トリルイソチオシアネートと順次反応させてチオカルバモイル-チアゾリジン誘導体に変換し、HPLC で標品と保持時間を比較することにより<sup>43</sup>、D-glucoseであることを確認した。したがって、**24**の母核となっている2つの糖はいずれも D-glucose である。スペクトルの芳香族領域には9つのシングレット [ $\delta$  7.16, 6.66, 6.65, 6.51, 6.50, 6.47, 6.46, 6.33, 6.33] 及び互いにカップリングしたダブルツ



**24**

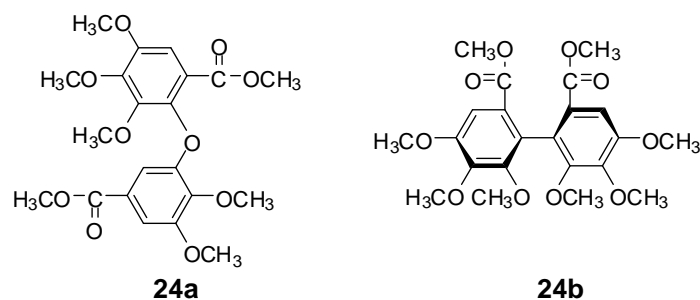
ト [ $\delta$  7.30, 6.84 (d,  $J=1.9$  Hz)]が観察された。これら芳香族水素はすべて、HMBC スペクトルにおいて  $\delta$  162 ~ 169 の範囲に観察される 10 個の 3,4,5-trihydroxybenzoyl 基のエステル炭素との相関を示した (Fig. 12)。これら 10 個のエステル炭素のうち 8 個は、 $\delta$  167~169 の範囲に認められたが、2 つのシグナルだけが高磁場の  $\delta$  162.4 と 165.0 に出現していた。このうち、 $\delta$  165.0 のカルボニルシグナル [dehydrodialloyl (DHDG) C-7]は、一方のグルコースのアノマー水素 [ $\delta$  6.16 (Glc-1)]とメタカップリングした芳香族ダブルットシグナル [ $\delta$  7.30, 6.84]の計 3 つの

水素シグナルと HMBC 相関を示した。もう一方の  $\delta$  162.4 のエステル炭素シグナル (DHDG C-7')は、もう一つのグルコースのアノマー水素 ( $\delta$  6.06)と芳香族水素シグナル ( $\delta$  7.16, s)との間に HMBC 相関を示した (Fig. 12)。残りの 8 つのエステル炭素はグルコースの 2 位 ~ 6 位のプロトンおよび  $\delta$  6.66~6.33 の 8 本の芳香族水素シグナルと相関を示した。これらの芳香族プロトンと相関を示す芳香族炭素シグナルは、そのケミカルシフトが化合物 **11** のものとほぼ一致しており、hexahydroxydiphenoyl (HHDP) 基に帰属された。

Table 8  $^1\text{H}$ - (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ - (125 MHz) NMR data for compound **24** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

<b>24</b>		
Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
COO attached to Glc-3, 3'		169.2, 169.2
COO attached to Glc-4, 4'		168.5, 168.4
COO attached to Glc-6, 6'		167.9 (2C)
COO attached to Glc-2, 2'		167.8, 167.7
HHDP-1, 1'		116.0, 115.9, 115.7 (2C), 114.9, 114.9, 114.2, 114.1
HHDP-2, 2'		126.3 (4C), 125.9, 125.9, 125.8, 125.7
HHDP-3, 3'	6.66, 6.65, 6.51, 6.50, 6.47, 6.46, 6.33, 6.33 (each 1H, s)	108.3, 108.2, 107.5 (2C), 107.3, 107.2, 107.1 (2C)
HHDP-4,6,4',6'		145.2 (2C), 145.1 (2C), 145.1 (2C), 145.0 (2C), 144.5 (6C), 144.4 (2C)
HHDP-5, 5'		136.6 (2C), 136.5, 136.4 (2C), 136.3, 136.2, 136.1
DHDG-1		119.3
DHDG-2	6.84 (1H, d, 1.9)	108.1
DHDG-3		148.2
DHDG-4		141.1
DHDG-5		146.6
DHDG-6	7.30 (1H, d, 1.9)	112.2
DHDG-7		165.0
DHDG-1'		113.3
DHDG-2', 4'		141.1, 137.7
DHDG-3'		141.6
DHDG-5'		143.4
DHDG-6'	7.16 (1H, s)	109.6
DHDG-7'		162.4
Glc-1	6.16 (1H, d, 8.5)	92.2
Glc-1'	6.06 (1H, d, 8.7)	91.9
Glc-2, 2'	5.13 (1H, dd, 8.5, 9.2) 5.11 (1H, dd, 8.7, 9.2)	75.8, 75.7
Glc-3,3'	5.41, 5.38 (each 1H, dd, 9.2, 10.0)	77.2, 77.1
Glc-4, 4'	5.14, 5.13 (each 1H, t, 10.0)	69.0 (2C)
Glc-5,5'	4.45, 4.41 (each 1H, ddd, 1.4, 6.9, 9.9)	73.4, 73.3
Glc-6, 6'	5.31, 5.29 (each 1H, dd, 6.9, 13.5) 3.82, 3.77 (each 1H, dd, 1.4, 13.5)	63.0, 62.9

Measured in acetone- $d_6$



アシル基については、化学的な分解反応によって確認した。まず、化合物 **24** を  $\text{CH}_2\text{N}_2$  でメチル化し、生成物をアルカリ条件下で加水分解した。生じたカルボン酸は  $\text{CH}_2\text{N}_2$  でメチルエステルに変換し、dimethyl pentamethyl dehydrodigallate (**24a**) と dimethyl (*S*)-4,4',5,5',6,6'-hexamethoxydiphenolate (**24b**) を得た。化合物 **24b** のビフェニル結合のアトロプ異性が *S*-配置であることは、旋光度が負の値 ( $[\alpha]_D -24.0$ ) を示したことから確認した<sup>50</sup>。上述のHMBC相関はDHDG基の二つのカルボニルエステルが両方のアノマー水酸基に結合していることを示している。HHDPエステルの結合位置は以下のように決定した。2つのグルコースは前述のとおりシグナルの結合定数が大きいことから<sup>4</sup> $\text{C}_1$ 配座をとっている。エラジタンニン類で(*S*)-HHDP基が結合するグルコースが<sup>4</sup> $\text{C}_1$ 配座をとるのは、HHDP基が2,3位および4,6位を架橋する場合にだけ可能である<sup>37</sup>。また、グルコース6位のメチレン水素が $\delta$  5.3付近と $\delta$  3.8付近に大きく分かれて ( $\Delta\delta > 1.4$ ) 観察されたことは、HHDP基がグルコースの4,6位に結合していることを示している [ $\delta$  5.31, 5.29

(each 1H, dd,  $J=6.9, 13.5$  Hz, Glc-6a, 6a'), 3.82, 3.77 (each 1H, dd,  $J=1.4, 13.5$  Hz, Glc-6b, 6b')] ]<sup>37</sup>。エステルの位置は、化合物 **24** を熱水で部分加水分解したときに2,3,4,6-bis-(*S*)-HHDP-D-glucoseの $\alpha$ と $\beta$ の混合物であるpedunculagin (**10**)が生成したことから支持された。

これらの分光学的および化学的な検討の結果から、この化合物 **24** の構造はFig. 12に示すようなものと決定し、euscaphinin と命名した。このタンニンは化合物 **11** のガロイル基の分子間酸化的カップリングにより生成すると推定される。*m*-Dehydrodigalloyl 基を有するエラジタンニン二量体は、バラ科<sup>51,52</sup>、ギョリュウ科<sup>53</sup>、ドクウツギ科<sup>54</sup>、トウダイグサ科<sup>55</sup>、スイレン科<sup>56,57</sup>の植物から分離されている報告があるが、HHDP基とDHDG基のみを構成アシル基とするもので2つのユニットの両方が $\beta$ 配置のものは化合物 **24** が初めての例である<sup>58</sup>。

エラジタンニン **11** と **24** はゴンズイの葉だけから分離され、樹皮や材には含まれていなかった。

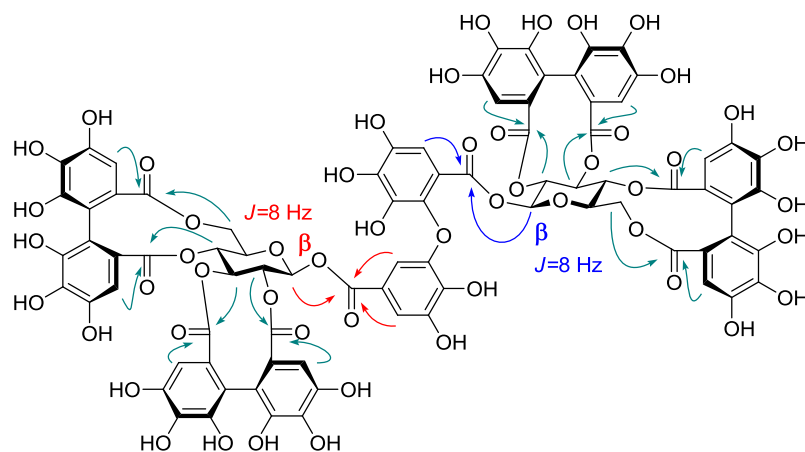


Fig. 12 Important HMBC correlations for **24**

### 3 樹皮に含まれるフェノール成分

#### 1) 抽出と分析

2007年5月に採集した新鮮な樹皮 500 g を水アセトン (4:1, v/v, 1L) と共にワーリングブレンダーで破碎し、ろ過した。残渣はさらに水アセトン (4:1, v/v, 1L) で2回抽出した。ろ液は合わせて減圧濃縮し、不溶物をろ去した後、水溶液を Diaion HP20SS カラムクロマトに付し、Fr. 1~5 に分画した。Fr. 4 から結晶が得られたので、その結晶について <sup>1</sup>H-および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定した。

#### 2) 既知化合物の同定

Fr. 4 から得た白色の結晶は、NMR スペクトルを文献値<sup>59-61)</sup>と比較した結果、3,3'-di-*O*-methyl ellagic acid (**25**)であることが明らかとなった。

Fig. 13 に、ゴンズイの葉と樹皮についての HPLC プロファイルを示す。葉の主成分は 1( $\beta$ )-*O*-galloyl pedunculagin (**11**)であり、樹皮の主成分は 3,3'-di-*O*-methyl ellagic acid (**25**)であった。

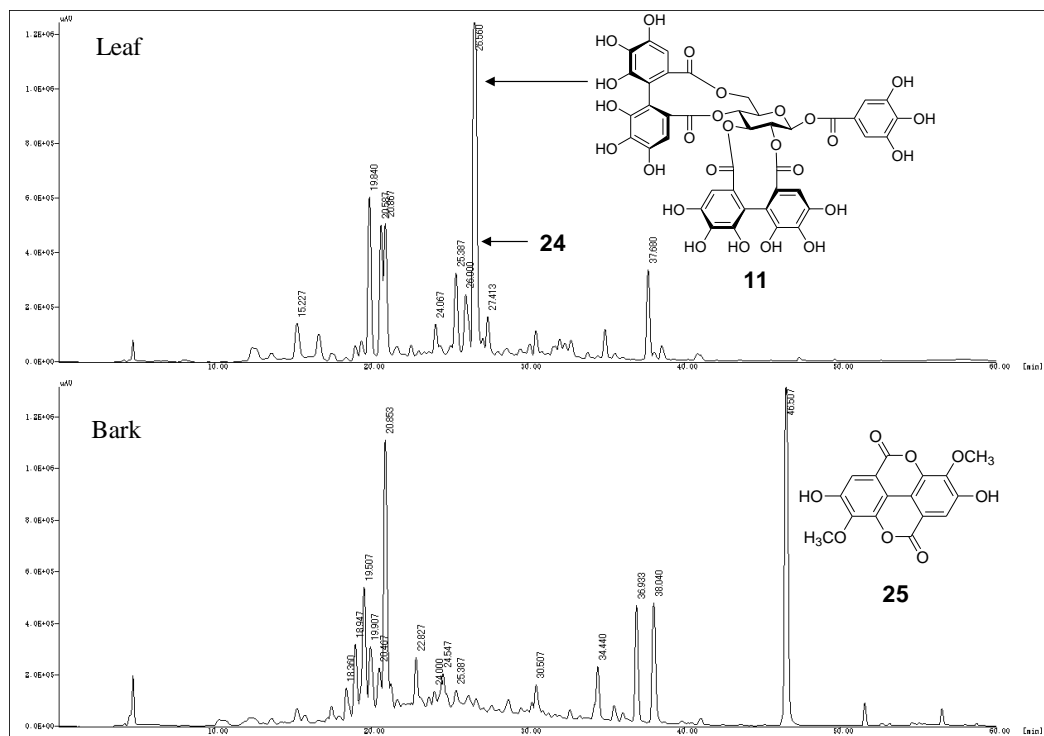
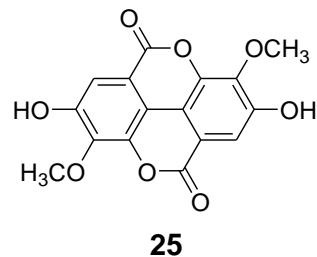


Fig. 13 HPLC analysis for leaf and bark on *E. japonica*

#### 4 小括

ゴンズイの葉の主成分は 1( $\beta$ )-*O*-galloyl pedunculagin (**11**)であり、一方、樹皮の主成分は 3,3'-di-*O*-methyl ellagic acid (**25**)であった。1( $\beta$ )-*O*-galloyl pedunculagin (**11**)には、A-kinase の  $\beta$ -regulatory subunit における選択

的阻害活性や C-kinase の自己リン酸化阻害活性といったキナーゼ阻害活性を有すると報告されており、ゴンズイの葉は **11** を大量に含有し、かつ精製が容易であることから、**11** の原料として有用と考えられる。

## 第5章 ヤマハゼのフェノール成分

### 1 ヤマハゼについて

ヤマハゼ (*Rhus sylvestris* Sieb. et Zucc., ウルシ科)は、本州・四国・九州に分布する日本固有種である。ヤマハゼの樹皮はかつて染色に使用されたことから、埴にしめ (ハニシメ)、黄櫨 (ハジ)と呼ばれ、転じてハゼとなったといわれている。同属のハゼノキ (*R. sccedanea* L.)は、果実から木蠟を採取し、和ろうそくが作られるが、山中に自生するヤマハゼは現在利用されていない。ハゼノキの木材中の成分については、主成分としてフラボンの一種である fustin を含有し、染色に関与する成分は fisetin であることが報告されている<sup>62)</sup>。ウルシ科の *Continus cogggria* の心材は染色に利用されており、心材のメタノール抽出物から fisetin, taxifolin, butein, sulfretin, fustin などが単離された報告もある<sup>63)</sup>。また、ヌルデ属の植物は成分精査が行われ、抗酸化活性をはじめ、様々な活性評価について報告されている<sup>10)</sup>。しかし、ヤマハゼの含有成分については Ding ら<sup>64)</sup>のテルペン配糖体などに関する報告だけである。そこで、今まで検討されていないヤマハゼの材のフェノール成分について精査した。また、近年、抗酸化活性の評価指標として用いられている ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)法<sup>65-69)</sup>を用いて含有成分について評価した。

### 2 ヤマハゼ材のフェノール成分

#### 1) 抽出と分離

ヤマハゼの心材を自然乾燥させたチップ 500 g を 80%含水アセトンで3回抽出した。得られたエキスは合わせて減圧濃縮後、水溶液とし、Sephadex LH-20 クロマトに付し、分画した (Chart 4-1)。さらに繰り返し分離・精製して、6種の既知化合物および2種の新規化合物を得た。

#### 2) 既知化合物の同定

エキスから分離した6種の既知化合物は、<sup>1</sup>H-および<sup>13</sup>C-NMR スペクトルを標品または文献値と

比較することにより、fustin (26)<sup>70,71)</sup>, eriodictyol (27)<sup>72,73)</sup>, 2,3',4',6-tetrahydroxy-2-benzylcoumaranone (28)<sup>74)</sup>, sulphuretin (29)<sup>73,75)</sup>, gallic acid (6), polygalloyl-β-D-glucose (30)<sup>76)</sup>と同定した。

Polygalloyl-β-D-glucose (30)は医薬品のタンニン酸と同じ物質であり、ヌルデ属の材から得られたのは今回が初めてである。また、ウルシ科の *Rhus verniciflua* の心材や枝も fustin (26) および sulphuretin (29)を含有しており、抗酸化活性<sup>71,77)</sup>、抗変異原性活性<sup>78)</sup>および抗腫瘍活性<sup>79)</sup>が報告されている。29については、加齢や高血糖によって誘発される終末糖化産物の阻害効果がポジティブコントロールの aminoguanidine より10倍高いことが報告されている<sup>80)</sup>。

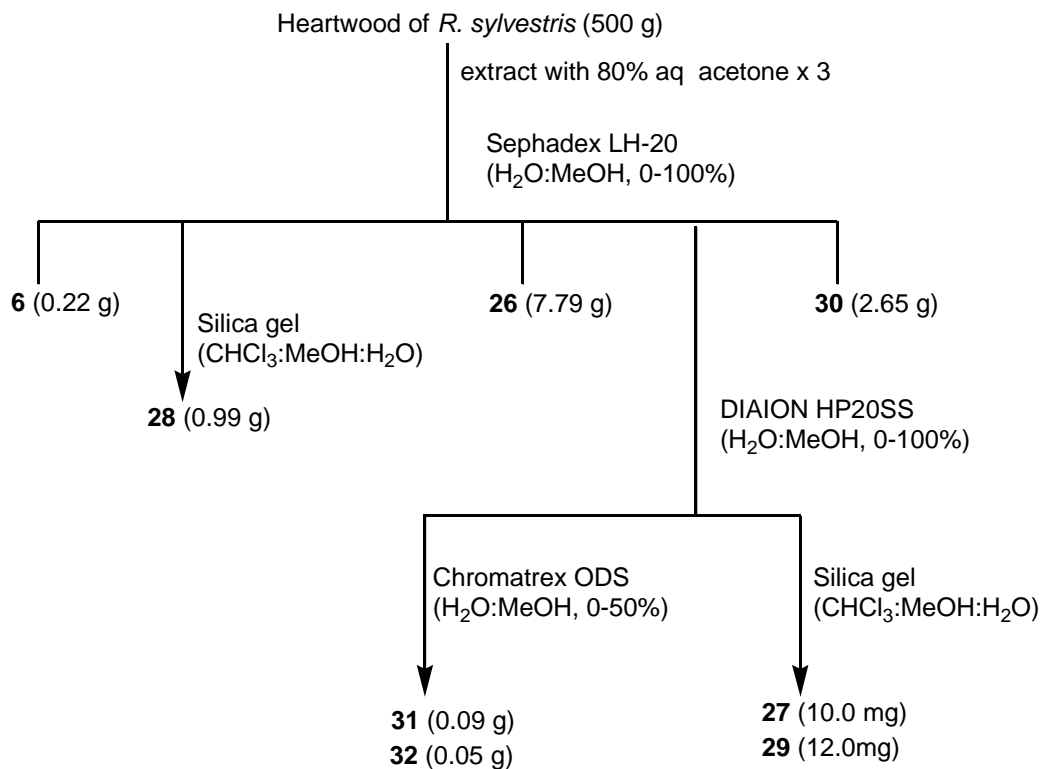
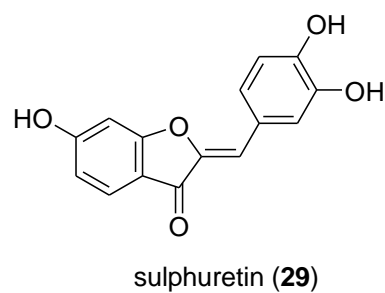
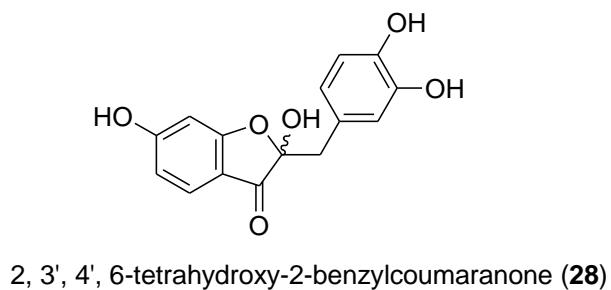
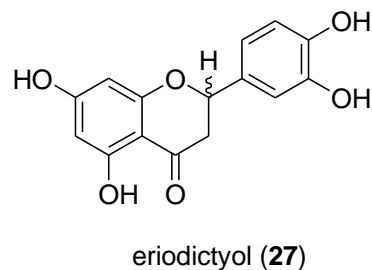
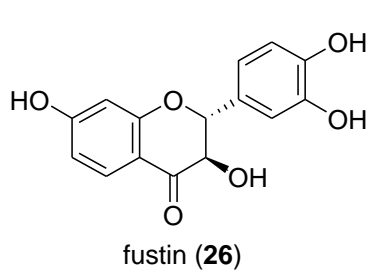
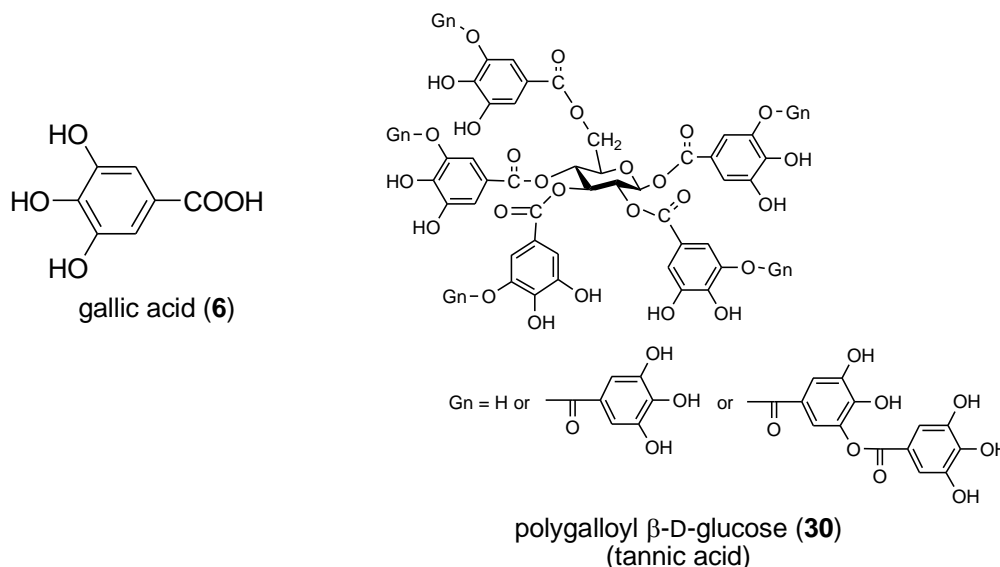


Chart 4-1 Extraction and fractionation







### 3) 新規化合物の構造解析

#### (i) 3-*O*-Galloyl fustin (31)

化合物 **31** は, HR-FAB-MS において  $[M+H]^+$  が  $m/z$  441.0845 に観察されたことから, 分子式  $C_{22}H_{16}O_{10}$  であることが示された.  $^1H$ -NMR スペクトルを測定した結果, fustin と同様のシグナルが検出されたが,  $\delta$  7.03 にガロイル基由来のシングレットシグナルが検出され, C 環 3 位のシグナルが  $\delta$  4.53 から  $\delta$  5.90 に低磁場へシフトしていたことから, C 環 3 位にガロイル基がエステル結合したと考えられた.  $^{13}C$ -NMR スペクトルの測定結果からも fustin のシグナルに加え,  $\delta$  165, 145, 139, 110 にガロイル基由来のシグナルが認められた. さらに, tannase による加水分解を行った結果, fustin (**26**) と gallic acid (**6**) が生成したことから, 化合物 **31** は 3-*O*-galloyl fustin であると決定した (Fig. 14).

#### (ii) 3' (4')-*O*-Galloyl fustin (32)

化合物 **32** は, HR-FAB-MS で  $[M+H]^+$  441.0817 に認められ, 化合物 **31** と同じ分子式  $C_{22}H_{16}O_{10}$  を持つことがわかった. しかし, TLC 分析では化合物 **31** の R<sub>f</sub> 値とは一致せず, 異なる構造を有することが示唆された. 化合物 **32** は TLC 分析ではシングルスポットを示したが,  $^1H$ -NMR スペクトルを測定した結果, 重複したシグナル (出現比 1:1) を示した. 化合物 **32** の A および C 環由来のプロトンシグナルは **26** のものと一致したものの, B 環の H-2', H-5', H-6' 由来のシグナルが低磁場にシフトしており,  $\delta$  7.27 にガロイル基由来のシングレットシグナルが認められたことから, B 環の 3 位と 4 位にガロイル基がエステル結合していると

考えられた. 先の polygalloyl- $\beta$ -D-glucose (**30**) などのように芳香環上で隣接するフェノール水酸基に結合しているエステルは溶液中で容易に転位して平衡混合物となることが知られている. したがって化合物 **32** は右に示すような 3' -galloyl および 4' -galloyl エステルの平衡混合物と考えられた<sup>81)</sup>. さらに, tannase による加水分解を行った結果, fustin (**26**) と gallic acid (**6**) に分解されたことから, 化合物 **32** は 3' (4')-*O*-galloyl fustin であると決定した (Fig. 14).

### 3 ORAC 法によるヤマハゼ含有成分の抗酸化活性の評価

近年, 食品, 植物, 栄養補助食品およびサプリメントなどの抗酸化活性の評価が行われるようになってきている. しかし, これまで異なる評価手法で測定された素材の活性はそのまま比較することが出来ないという問題が指摘されてきた. そこで, いくつかの手法があるなかで, 操作の簡便性や再現性などの点から ORAC 法は抗酸化活性評価の標準的手法とされつつある. その原理は, 一定の活性酸素種を発生させ, それによって分解される蛍光物質の蛍光強度の減少を経時的に測定するもので, 反応系に抗酸化物質が共存するとその蛍光強度の減少速度が遅延することを利用したものである<sup>69)</sup>.

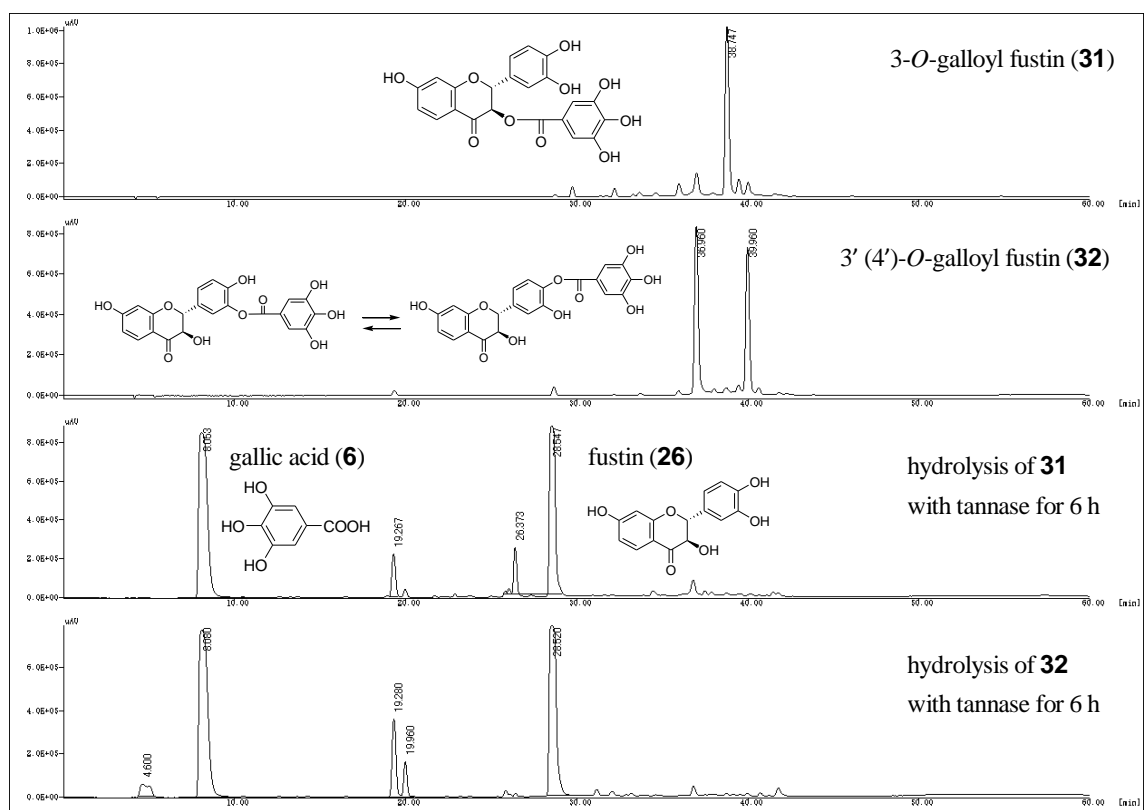
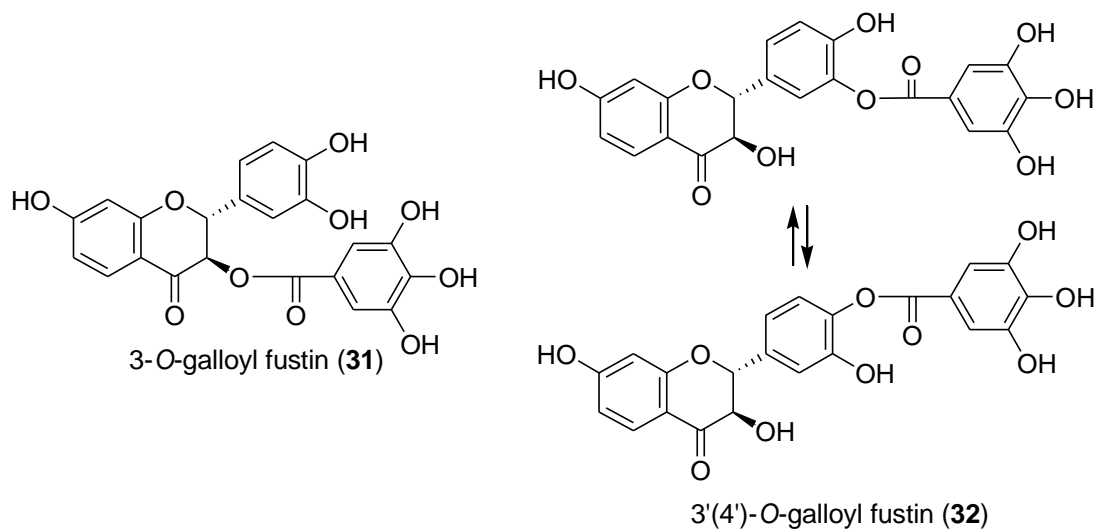


Fig. 14 Hydrolysis of **31** and **32** with tannase

ヤマハゼの含有成分である gallic acid (**6**)<sup>82)</sup>や fustin (**26**)<sup>83)</sup>については抗酸化活性の評価が行われているが、今回単離した他の3種の化合物についてORAC法を用いた抗酸化活性を測定した。

その結果, gallic acid (**6**)の測定値 8,436  $\mu\text{mol TE/g}$ と比較して, 主成分である fustin (**26**)は 23,806  $\mu\text{mol TE/g}$ , 2, 3', 4', 6-tetrahydroxy-2-benzylcoumaranone (**28**)が 30,090  $\mu\text{mol TE/g}$ , 新規化合物 3-*O*-galloyl fustin (**31**)が 18,202  $\mu\text{mol TE/g}$ ,

3' (4')-*O*-galloyl fustin (**32**)が 19,360  $\mu\text{mol TE/g}$ といずれも高い値を示した (Fig. 15). ウルシ科の *R. verniciflua*においても, **26**および**29**を含有する分画に高い抗酸化活性が示されており<sup>71, 77, 84)</sup>, 今回の結果と一致する. *R. verniciflua*は生薬原料として用いられているが, ヤマハゼは利用されていない. 今回の結果より, ヤマハゼは特に fustin (**26**)の含有量が多く, 資源として豊富であることから, fustinの製造原料として利用することが期待できる.

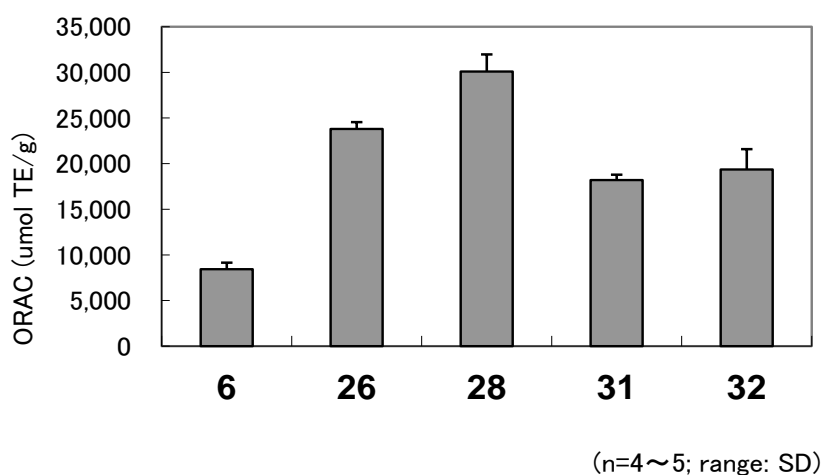


Fig. 15 ORAC values (Trolox equivalent,  $\mu\text{mol TE/g}$ ) of compounds **6**, **26**, **28**, **31** and **32**

#### 4 小括

ヤマハゼの心材では, fustin (**26**)が主成分であった. また, **26**にガロイル基が結合した2種の新規化合物を単離し, 構造決定した.

ウルシ科ヌルデ属の植物では, 様々な生理活性の評価が行われている. 今回, ORAC法によりヤマハゼの心材成分の抗酸化活性を評価した結果, gallic acid (**6**)と比較して, fustin (**26**),

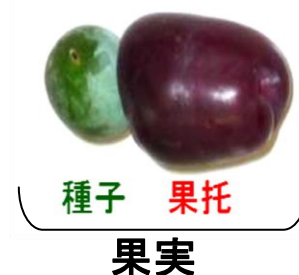
2, 3', 4', 6-tetrahydroxy-2-benzylcoumaranone (**28**), 新規化合物 3-*O*-galloyl fustin (**31**)および 3' (4')-*O*-galloyl fustin (**32**)のいずれもが高い抗酸化活性を示した.

ヤマハゼは特に fustin (**26**)の含有量が多く, 資源として豊富であることから, fustinの製造原料として利用することが期待できる.

## 第6章 イヌマキの果実の成分

### 1 イヌマキについて

イヌマキ（犬槇, *Podocarpus macrophyllus*)は、マキ科の常緑針葉高木であり、関東以西の本州、四国、九州、沖縄、台湾などの比較的暖かい地域に分布し、長崎県では特に平戸市に広く自生している。材は、耐蟻性が強く建築用材として利用されている<sup>85)</sup>。また、イヌマキの樹皮および根には、生理活性を有する多数のノルジテルペンジラクトン類が含まれていることが報告されている<sup>86-88)</sup>。果実は、秋になると熟し、赤紫色の果托の上に緑色の種子を付ける。果托は、甘く食べることもでき、果実酒などへの利用も可能である<sup>89)</sup>。しかし、この果托および種子に含まれる成分については、明らかとなっていない。そこで本研究ではイヌマキの果托および種子に含まれる成分について詳細な検討を行った。



### 2 イヌマキの果托の成分

#### 1) 抽出と分離

イヌマキ果托中の色素成分がアントシアニンであることを予測して、酸性条件下で抽出・分離を行った。新鮮な果托 500 g をトリ

フルオロ酢酸酸性含水アセトニトリルで抽出後、MCI gel CHP20P, Cosmosil 40C<sub>18</sub> PREP で分離・精製 (Chart 5-1)することにより、3種のアントシアニン (**33** ~ **35**)が得られた。

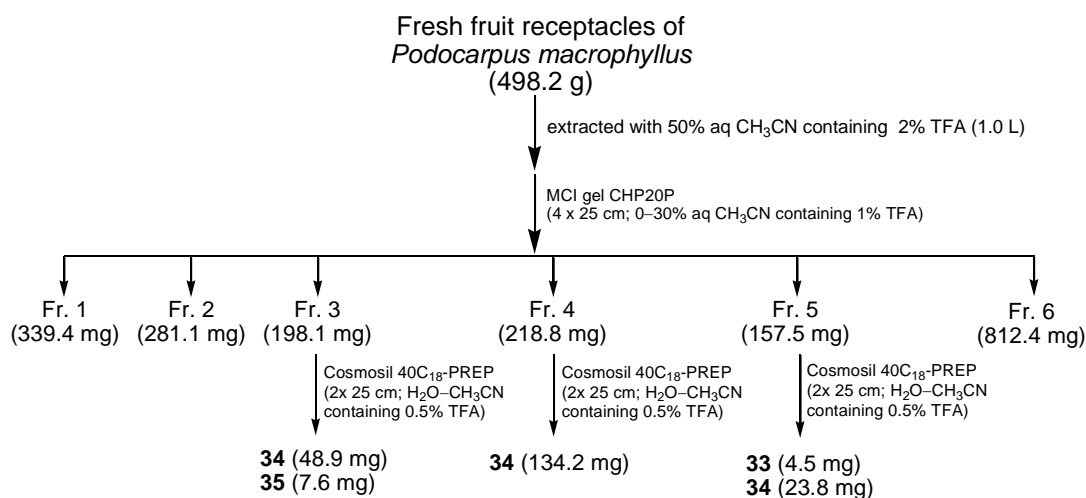


Chart 5-1 Extraction and fractionation

次に、果托に含まれるその他の成分を明らかにすることを目的として、イヌマキの果托 2.5 kg を MeOH, 次いで 50%含水アセトンで抽出後、エーテルおよび酢酸エチルで分配し、酢酸エチル可溶

部、水可溶部について、それぞれ各種カラムクロマトグラフィーで分離・精製した結果 (Chart 5-2), 4 種の新規化合物および 11 種の既知化合物が得られた。

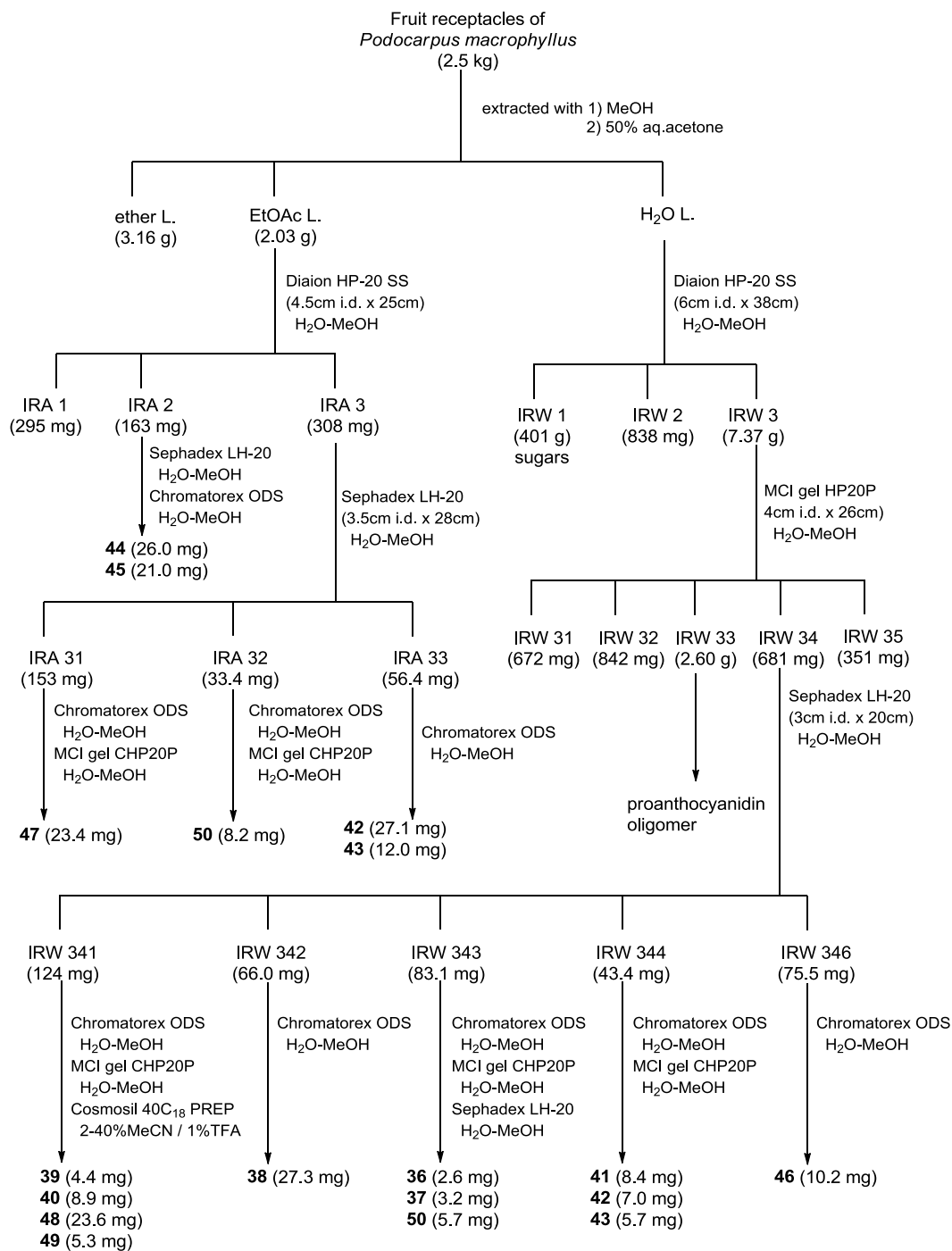


Chart 5-2 Extraction and fractionation

## 2 既知化合物の同定

果托の抽出・分離によって得られた14種の既知化合物は、<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを標品または文献値と比較することにより、

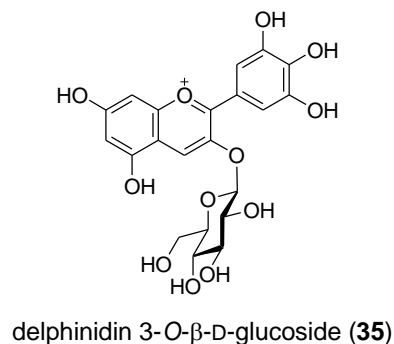
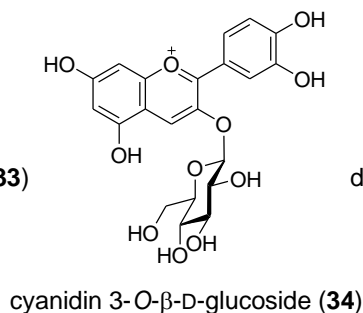
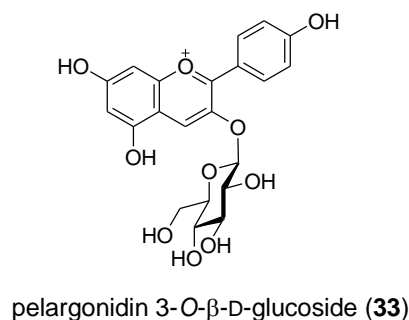
pelargonidin 3-O-β-D-glucoside (**33**)<sup>90</sup>, cyanidin 3-O-β-D-glucoside (**34**)<sup>91-93</sup>, delphinidin 3-O-β-D-glucoside (**35**)<sup>90</sup>, vitexin (**36**)<sup>93</sup>, 2''-O-rhamnosyl vitexin (**38**)<sup>94</sup>, 2''-O-rhamnosyl scoparin (**39**)<sup>95</sup>, 2''-O-glucosyl vitexin (**40**)<sup>96</sup>, quercetin (**41**), quercetin 3-O-glucoside (**42**)<sup>97</sup>, myricetin 3-O-glucoside (**43**)<sup>97</sup>, (+)-catechin (**44**), (+)-gallocatechin (**45**), (-)-epicatechin 3-O-gallate (**46**)と同定した。

化合物**37**は、詳細なNMRスペクトル値が記載された文献がないため、以下のように決定した。化合物**37**の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、化合物**36**のものと類似していたが、δ 6.88と7.98のパラ置換

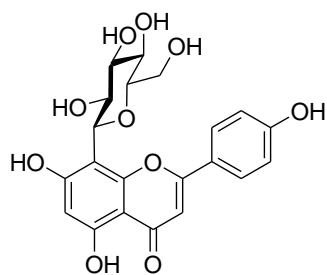
ベンゼン環のA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>型シグナルのかわりに、1組のABX型のシグナルが観察された。したがって、B環は1, 3, 4-置換ベンゼンであることがわかった。また、δ 3.93にメトキシ基由来のシグナルが観察されたことからB環の3位あるいは4位のいずれかがメトキシ基に置換したものであると推測した。最終的に、NOESYスペクトルにおいてメトキシ基とB環5位プロトンとの間に相関が見られたことから、化合物**37**はdiosmetin 8-C-glucosideであると同定した。

これらの化合物は、アントシアニン3種、フラボンC-配糖体5種、フラボノールおよびその配糖体3種、フラバン-3-オール3種に分類することができる。果托の主要な色素成分はcyanidin 3-O-β-D-glucoside (**34**)で、自然界に最も広く存在するアントシアニンであり、様々な生理活性が報告されている<sup>98</sup>。

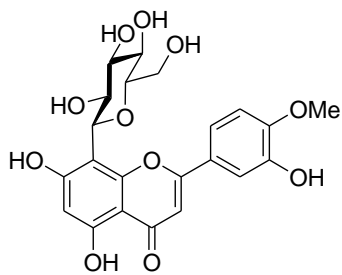
### アントシアニン



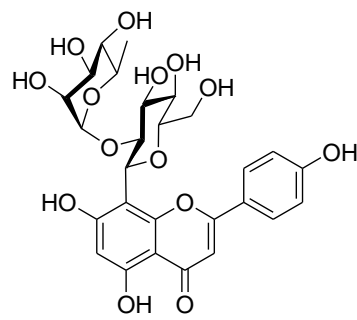
フラボン C-配糖体



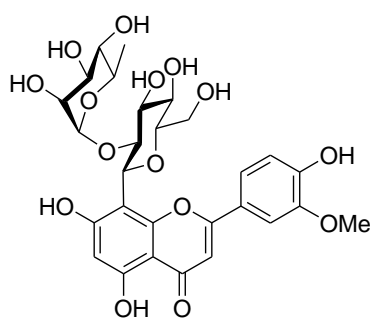
vitexin (36)



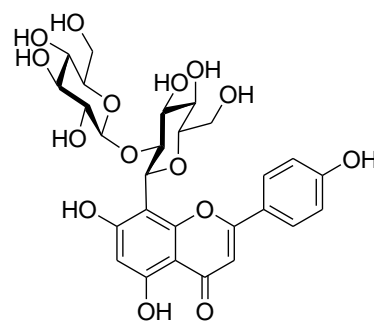
diosmetin 8-C-glucoside (37)



2''-O-rhamnosyl vitexin (38)

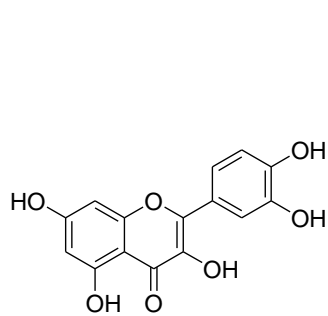


2''-O-rhamnosyl scoparin (39)

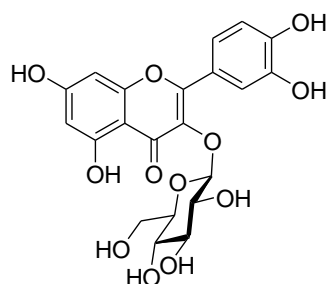


2''-O-glucosyl vitexin (40)

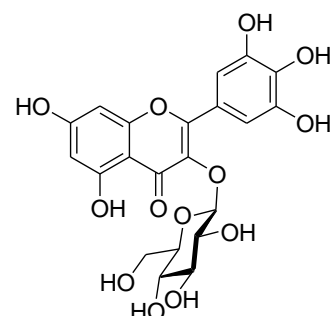
フラボノールおよびその O-配糖体



quercetin (41)

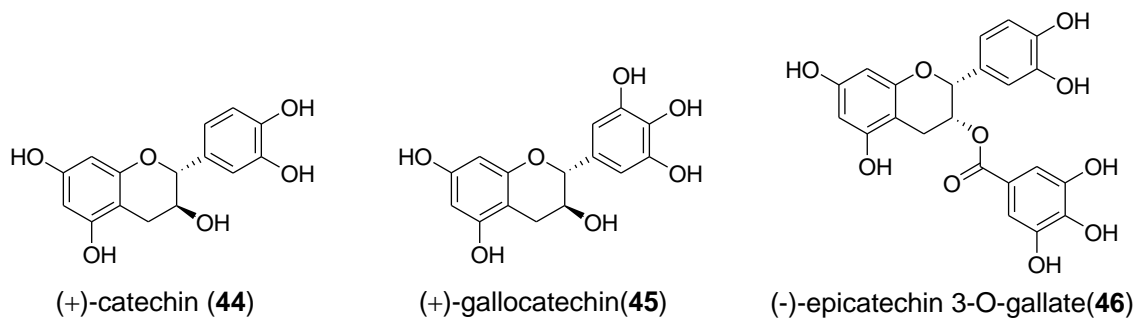


quercetin 3-O-glucoside (42)



myricetin 3-O-glucoside (43)

フラバン-3-オール

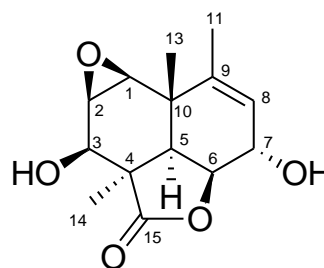


3 新規化合物の構造解析

(i) Podomacrin A (47)

化合物 **47** は、白色無晶形粉末であり、HR-FAB-MS の結果 ( $m/z$  267.1222,  $[M+H]^+$ ) より、分子式は  $C_{14}H_{18}O_5$  であると決定した。IR スペクトルにおいて、3446, 2974, 2933 および  $1761\text{ cm}^{-1}$  に吸収が見られたことから、ヒドロキシ基と  $\gamma$ -ラクトン環の存在が示唆された。 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおいて、1個のカルボニル基 ( $\delta$  180.2), 6個の  $sp^3$  メチン基 ( $\delta$  57.9, 51.7, 69.2, 52.2, 85.9, 69.8), 2個の  $sp^3$  四級炭素 ( $\delta$  48.8, 38.2), 3個のメチル基 ( $\delta$  18.7, 16.2, 26.3), 1個の  $sp^2$  メチン基 ( $\delta$  125.8) および 1個の  $sp^2$  四級炭素 ( $\delta$

146.7) に由来するピークが観察された (Table 9)。また、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルを解析した結果、Fig. 16 のような平面構造であると決定した。



podomacrin A (47)

Table 9  $^1\text{H}$ - (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$ - (125 MHz) NMR data for **47** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	HMBC (H to C)
1	3.54 (d, 4.2)	57.9	2, 3, 5, 9, 10, 13
2	3.36 (dd, 6.2, 4.2)	51.7	1, 3, 4
3	4.37 (d, 6.2)	69.2	1, 2, 4, 5, 14
4		48.8	
5	2.04 (d, 6.6)	52.2	1, 4, 9, 10, 13, 14, 15
6	4.60 (dd, 6.6, 2.9)	85.9	7, 10
7	4.45 (m)	69.8	
8	5.41 (m)	125.8	6, 10, 11
9		146.7	
10		38.2	
11	1.99 (3H, dd, 2.5, 1.6)	18.7	8, 9, 10
13	0.91 (3H, s)	16.2	1, 5, 9, 10
14	1.41 (3H, s)	26.3	3, 4, 5, 15
15		180.2	

Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$



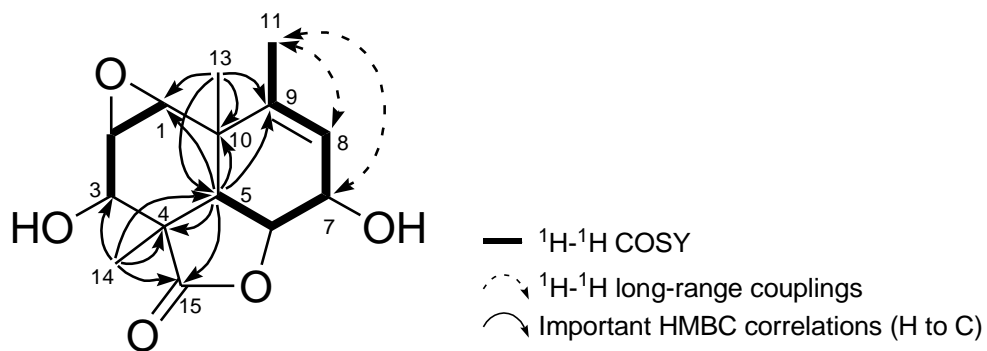


Fig. 16 Important HMBC correlations and long-range couplings for **47**

立体構造は、NOESY スペクトルにおいて、1位と2位、1位と5位、2位と3位と14位、5位と6位、5位と14位、6位と14位、7位と13位に相関が見られたことからFig. 17のように決定した。

以上の検討により、**47**の構造を前ページに示すようにノルセスキテルペンと決定し、文献未記載の物質であったので podomacrin A と命名した。

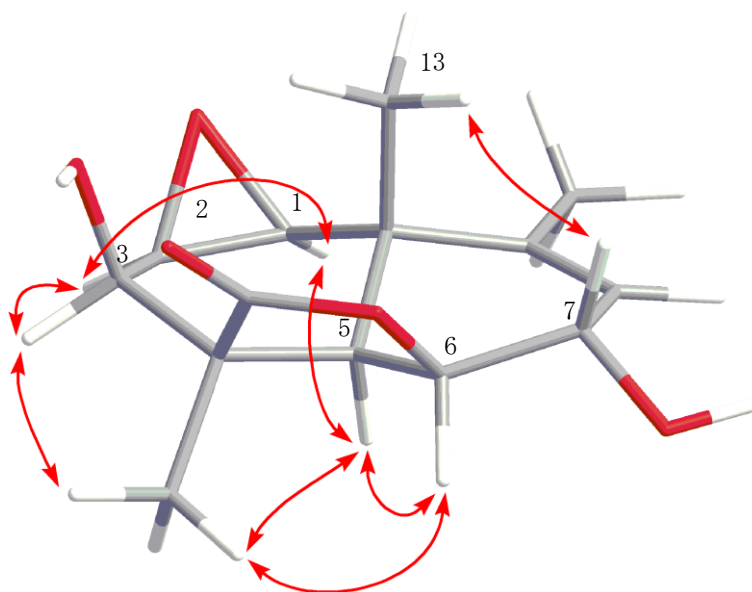
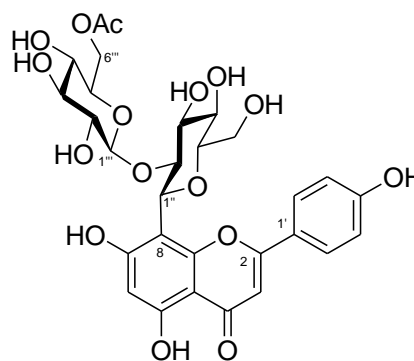


Fig. 17 NOESY correlations for **47**

(ii) 2''-O-(6'''-O-Acetyl glucosyl) vitexin (48)

化合物 **48** は、黄褐色無晶形粉末として得られた。HR-FAB-MS の結果 ( $m/z$  637.1798,  $[M+H]^+$ ) より、分子式は  $C_{29}H_{32}O_{16}$  と決定した。IR スペクトルでは、ヒドロキシ基、カルボニル基、芳香環の存在が示唆された。

$^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトルにおいて、化合物 **48** は、化合物 **40** と非常によく類似したシグナルを示したが、新たに  $^1H$ -NMR スペクトルにおいて  $\delta$  1.9 にシングレットシグナル、 $^{13}C$ -NMR スペクトルにおいて  $\delta$  20.7 と  $\delta$  172.9 にシグナルが見られたことから、化合物 **48** は **40** にアセチル基が結合した化合物であることが示唆された (Table 10)。また、 $^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトルでは、2種類の回転異性体由来のシグナルが観察されたが、これは **40** と同様にフラボン A 環 8 位に置換している糖ユニットと B 環との間で回転障害があるためと考えられる<sup>94)</sup>。2種類のシグナルが回転異性体由来するものであることは、NOESY スペクトルにおいて同一プロトン同士に負の相関が見られたことから支持された。さらに、 $^{13}C$ -NMR スペクトルにおいて **48** のフラボン A 環 6 位は  $\delta$  99.2 と  $\delta$  100.8 に、A 環 8 位は  $\delta$  105.2 と  $\delta$  103.9 にシグナルが観察



2''-O-(6'''-O-acetyl glucosyl) vitexin (**48**)

され、A 環 8 位にグルコースが結合した化合物と類似のケミカルシフトを示した<sup>94)</sup>。HMBC スペクトルよりアセチル基のプロトンと 6'''位の炭素との間に相関 ( $^4J$ )が見られたことからアセチル基は、6'''位に結合していることが明らかとなった (Fig. 18)。

糖の絶対構造については、未決定である。ただし、化合物 **48** が化合物 **40** と共存していることから、化合物 **40** と同じ D-glucose であると考えられる。

以上の検討に基づき、**48** は 2''-O-(6'''-O-acetyl glucosyl) vitexin と決定した。

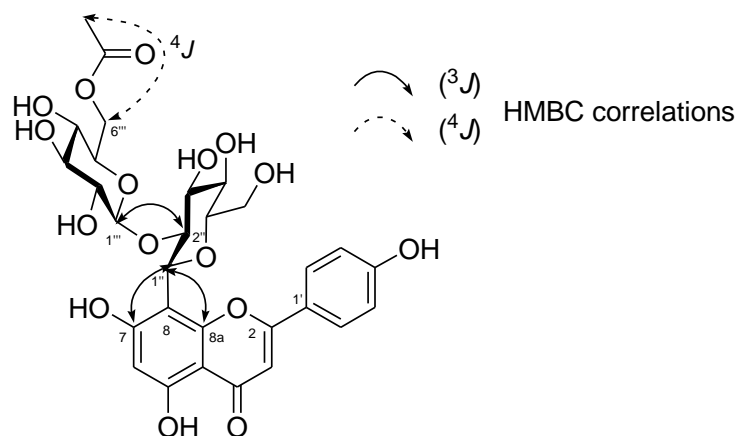


Fig. 18 Important HMBC correlations for **48**

Table 10  $^1\text{H}$ - (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ - (125 MHz) NMR data for **48** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

Position	major rotamer		minor rotamer		$^{13}\text{C}$	HMBC (H to C)
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$		
2		166.2			104.1	2, 4, 4a, 5 ( $^4J$ ), 1'
3	6.54 (s)	103.7	6.56 (s)		184.2	
4		184			105.4	
4a		105.6			162.7	
5		162.4			100.8	4 ( $^4J$ ), 4a, 5, 7, 8, 1'' ( $^4J$ )
6	6.21 (s)	99.2	6.18 (s)		164.6	
7		164.3			103.9	
8		105.2			157.3	
8a		158.3			123.7	
1'		130.1			129.8	2, 2', 3', 4', 5', 6'
2', 6'	7.98 (2H, d, 8.7)		7.86 (2H, 8.8)		117	1', 3', 4', 5'
3', 5'	6.935 (2H, d, 8.7)	117	6.928 (2H, 8.8)		162.8	
4'		162.8			75.2	7, 8a, 2'', 3'', 5''
1''	5.03 (d, 10.0)	73.7	5.18 (d, 9.6)		83.5	8, 1'', 3'', 1'''
2''	4.34 (dd, 10.0, 8.9)	79.2	4.04 (dd, 9.6, 9.2)		79.7	1'', 2'', 4''
3''	3.74 (dd, 9.3, 8.9)	80.5	3.80 (m)		70.7	3'', 5'', 6''
4''	3.66 (dd, 9.4, 9.3)	72	3.60 (dd, 9.6, 8.9)		82.7	6''
5''	3.45 (ddd, 9.4, 5.7,	82.9	3.53 (m)		62.1	4'', 5''
6''	3.95 (dd, 12.0, 2.2)	62.9	3.90 (dd, 12.3, 2.2)		106.1	2'', 3''', 5'''
	3.79 (m)		3.79 (m)		75.9	1''', 3'''
1'''	4.38 (d, 7.8)	104.7	4.29 (d, 7.7)		77.7	1''', 2''', 4''', 5'''
2'''	2.97 (dd, 9.2, 7.8)	75.5	2.91 (dd, 8.5, 7.7)		70.5	3''', 5''', 6'''
3'''	3.15 (t, 9.2)	77.5	3.18 (dd, 9.2, 8.5)		74.9	1''', 3''', 4'''
4'''	3.07 (dd, 9.6, 9.2)	70.4	2.97 (m)		64.3	4''', 5'''
5'''	2.93 (m)	74.7	3.02 (m)			
6'''	3.93 (dd, 11.6, 3.6)	64.1	3.77 (m)		20.8	Ac (C=O), 6''' ( $^4J$ )
	3.57 (dd, 11.6, 1.8)		3.74 (m)		172.93	
6'''-Ac (CH <sub>3</sub> )	1.92 (3H, s)	20.7	1.95 (3H, s)			
6'''-Ac (C=O)		172.89				

Measured in CD<sub>3</sub>OD; major rotamer : minor rotamer = 1.00 : 0.54.

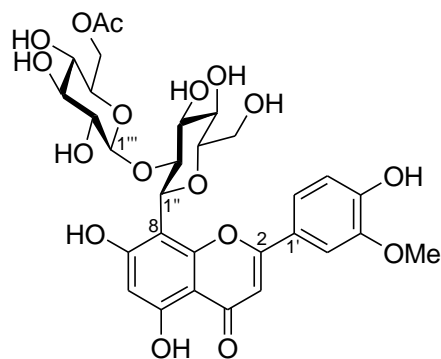
(iii) 2''-O-(6'''-O-Acetyl glucosyl) scoparin (49)

化合物 **49** は、黄褐色無晶形粉末として得られた。HR-FAB-MS ( $m/z$  667.1884,  $[M+H]^+$ ) より、分子式は  $C_{30}H_{34}O_{17}$  であると決定した。

$^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトルは、B 環由来のシグナルを除いて化合物 **48** のものとよく類似していた。B 環のシグナルは **48** が  $A_2B_2$  型であったのに対して、**49** のものは ABX 型であり、三置換ベンゼンであることを示していた。またメトキシ基のシグナルが  $\delta$  4.01 に新たに見られたことから、分子式を考慮すると化合物 **49** は、B 環に水酸基とメトキシ基を持つと示唆された (Table 11)。

このメトキシ基は、NOESY スペクトルにおいて 2' 位と相関を示したことから、3' 位に置換していることが明らかとなった (Fig. 19)。

グルコースの絶対構造については、未決定



2''-O-(6'''-O-acetyl glucosyl) scoparin (**49**)

であるが、共存する関連  $\alpha$ -配糖体と同様、D-glucose であると推測される。

以上の検討に基づき、**49** は 2''-O-(6'''-O-acetyl glucosyl) scoparin と決定した。

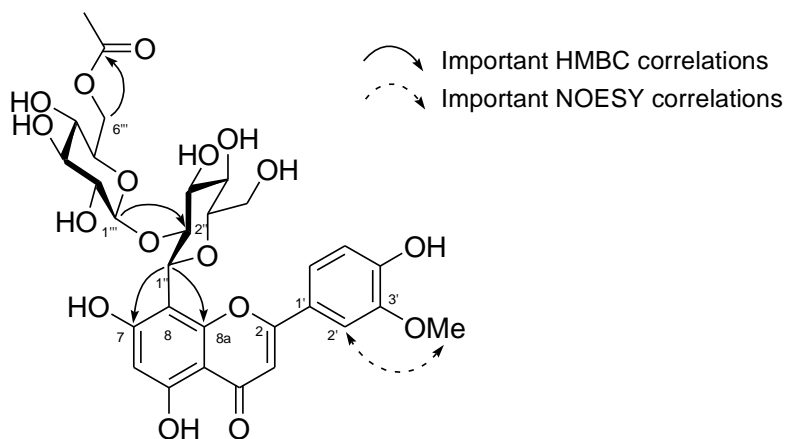


Fig. 19 Important HMBC and NOESY correlations for **49**

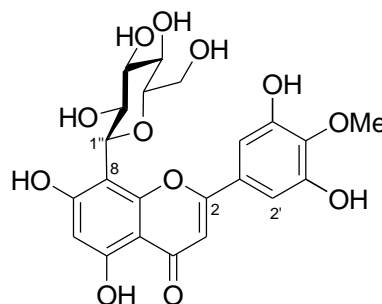
Table 11  $^1\text{H}$ - (500 MHz),  $^{13}\text{C}$ - (125 MHz) NMR data for **49** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in

Hz)	Position	major rotamer		minor rotamer		HMBC (H to C)
		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	
2			166.19		166.25	
3		6.59 (s)	104.2	6.58 (s)	104.3	2, 4, 4a, 1'
4			184.1		184	
4a			105.6		105.4	
5			162.7		162.5	
6		6.19 (s)	100.8	6.22 (s)	99.2	4a, 5, 7, 8
7			166.2		164.5	
8			103.9		105.1	
8a			157.2		158.4	
1'			124.1		124	
2'		7.63 (d, 2.1)	111	7.45 (d, 2.1)	111.2	2, 3', 4', 6'
3'			149.4		149.6	
4'			151.8		152.3	
5'		6.93 (d, 8.4)	116.7	6.96 (d, 8.4)	116.7	1', 3', 4'
6'		7.48 (d, 8.4, 2.1)	121.8	7.75 (dd, 8.4, 2.1)	122.9	2, 2', 4'
1''		5.23 (d, 9.8)	75.5	5.03 (d, 10.1)	73.6	7, 8, 8a, 2'', 3''
2''		3.99 (m)	84	4.41 (dd, 10.1, 7.8)	79.2	8, 1'', 3'', 1'''
3''		3.74 (d, 9.2, 8.9)	79.8	3.74 (m)	80.6	2'', 4''
4''		3.64 (dd, 9.6, 9.2)	70.5	3.61 (dd, 9.6, 9.2)	72.1	3'', 5'', 6''
5''		3.52 (ddd, 9.6, 4.6,	82.7	3.45 (m)	83	
6''		3.89 (dd, 12.0, 2.3)	61.9	3.94 (m)	63	
		3.82 (dd, 12.0, 4.6)		3.75 (m)		
1'''		4.30 (d, 7.8)	106.2	4.42 (d, 7.8)	104.8	2''
2'''		2.93 (m)	76	2.95 (m)	75.4	1''', 3'''
3'''		3.18 (dd, 9.2, 8.9)	77.8	3.15 (dd, 9.2, 8.9)	77.6	2''', 4'''
4'''		2.93 (m)	70.5	3.10 (dd, 9.4, 8.9)	70.4	3''', 5'''
5'''		3.02 (ddd, 9.8, 4.5,	75	2.93 (m)	74.7	6'''
6'''		3.80 (dd, 11.9, 4.5)	64.4	3.95 (m)	64.1	Ac (C=O), 4''', 5'''
		3.74 (m)		3.57 (dd, 12.0, 2.0)		
3'-OCH <sub>3</sub>		4.01 (3H, s)	56.7	3.98 (3H, s)	57.1	2'
6'''-Ac (CH <sub>3</sub> )		1.95 (3H, s)	20.74	1.93 (3H, s)	20.7	Ac (C=O)
6'''-Ac (C=O)			172.9		172.9	

Measured in CD<sub>3</sub>OD; major rotamer : minor rotamer = 1.00 : 0.82.

(iv) Tricetin 4'-methyl ether 8-*C*-glucoside (50)

化合物 **50** は、 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを 25 °C で測定したところ、いくつかのシグナルがブロードに現れ、解析ができなかった。そこで、80 °C で測定したところシグナルが比較的シャープに現れたことから、80 °C における NMR スペクトルを詳細に解析した (Fig. 20, 21)。 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルでは、B 環が対称な 1, 3, 4, 5-四置換ベンゼンであるフラボンおよび 1 つの *C*-配糖体結合した糖に由来するシグナルが認められたほか、1 つのメトキシ基に由来するシグナルも認められた (Table 12)。糖については、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおける結合定数および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルのシグナルパターンより、グルコースであると考えられた。グルコースの結合位置については、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおいて A 環に由来するシグナルが 1 本しか観察されなかったことから ( $\delta$  6.26, s), A 環の 6 位あるいは 8 位であると考えられた。25 °C における  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおいて、グルコースおよび B 環由来のシグナル



tricetin 4'-methyl ether 8-*C*-glucoside (**50**)

がブロードに現れていたことは、グルコースと B 環の間に回転障害があることを示しており、このことからグルコースは、A 環の 8 位に結合していると決定した。メトキシ基の位置については、UV スペクトルにおいて NaOAc を加えることにより 331 nm の極大吸収波長が 356 nm へシフトし、吸収強度が低下したことから、4'位にメトキシ基が置換していると決定した。

以上の検討により、**50** は tricetin 4'-methyl ether 8-*C*-glucoside と決定した。

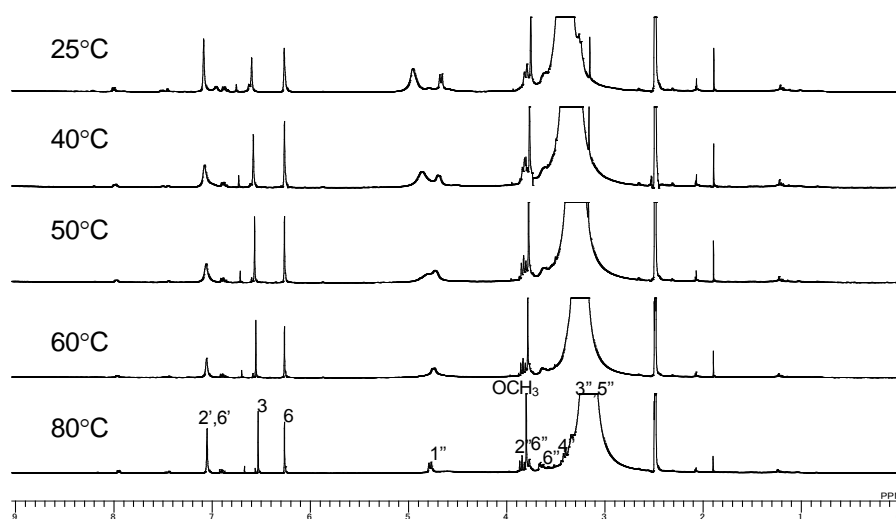


Fig. 20  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) spectra of **50** measured at various temperature (in  $\text{DMSO}-d_6$ )

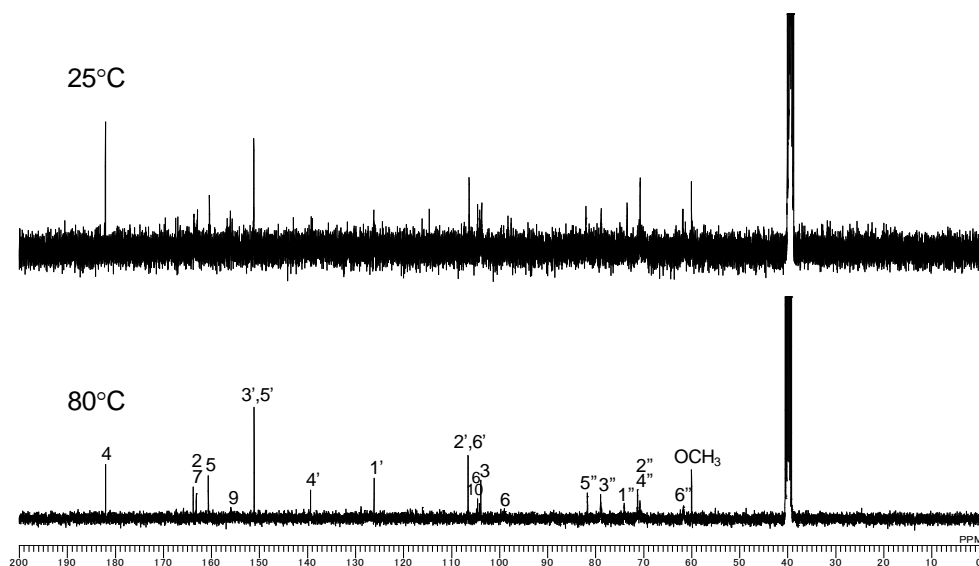


Fig. 21  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) spectra of **50** measured at 25 °C and 80 °C (in  $\text{DMSO-}d_6$ )

Table 12  $^1\text{H}$ - (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ - (100 MHz) NMR data for **50** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2, 7		163.4, 162.8
3	6.53 (1H, s)	103.5
4		181.7
4a, 8		104.2, 103.8
5		160.3
6	6.26 (1H, s)	98.6
8a		156.6
1'		125.8
2' 6'	7.05 (2H)	106.2
3', 5'		150.7 (2C)
4'		139
1''	4.78 (1H, d, 9.6)	73.7
2''	3.84 (1H, dd, 9.6, 8.8)	70.9, 70.4
3''	3.1-3.4 (covered with $\text{H}_2\text{O}$ )	78.6
4''	3.42 (1H, t, 9.0)	70.9, 70.4
5''	3.1-3.4 (covered with $\text{H}_2\text{O}$ )	81.3
6''	3.79 (1H, br d, 11.7)	61.3
	3.65 (1H, dd, 11.7, 5.4)	
$\text{OCH}_3$	3.80 (3H, s)	59.6

Measured in  $\text{DMSO-}d_6$

### 3 イヌマキの種子の成分

#### 1) 抽出と分離

種子に含まれる成分を明らかにすることを目的として、イヌマキ種子 1.48 kg を MeOH および 50% 含水アセトンで抽出後、エーテルおよび酢酸エチ

ルで分配し、エーテル可溶部と水可溶部について、各種カラムクロマトグラフィーで分離・精製した結果 (Chart 5-3)、2 種の新規化合物を含む 20 種類の化合物が得られた。

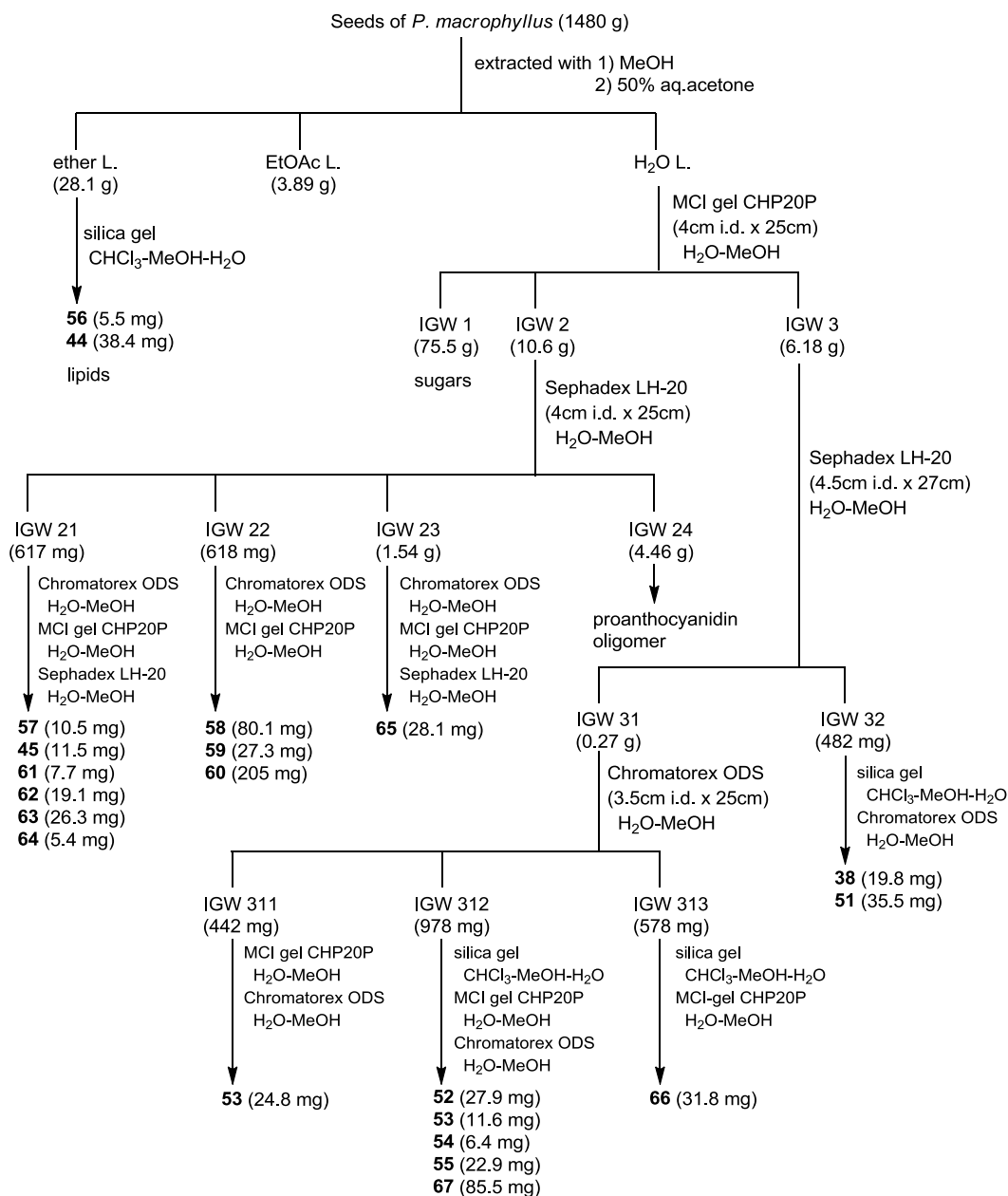


Chart 5-3 Extraction and fractionation of seed

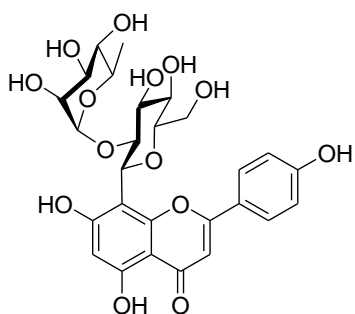


## 2) 既知化合物の同定

18種の既知化合物は、フラボン配糖体2種、ラクトン1種、フラバン-3-オール類4種、プロアントシアニジン二量体7種、プロアントシアニジン三量体1種、その他化合物3種に分類される。これら既知化合物は、<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを標品または文献値と比較することにより、2''-O-rhamnosyl vitexin (38), 2''-O-rhamnosyl orientin (51)<sup>99)</sup>, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propyl-β-D-glucopyranoside (52)<sup>100)</sup>, 4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenyl-β-D-gluc

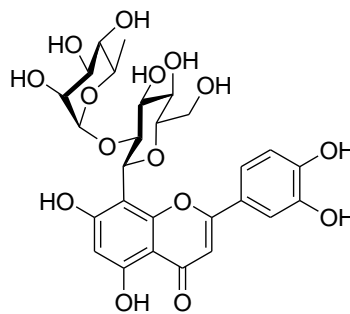
opyranoside (53)<sup>101)</sup>, icariside B5 (54)<sup>102,103)</sup>, nagilactone C (55)<sup>104,105)</sup>, (-)-epicatechin (56), (+)-catechin (44), (-)-epigallocatechin (57), (+)-gallocatechin (45), gallocatechin-(4α→8)-catechin (58)<sup>106)</sup>, prodelphinidin B-4 (59)<sup>107)</sup>, prodelphinidin B-3 (60)<sup>106,108)</sup>, procyanidin B-1 (61)<sup>109)</sup>, epigallocatechin-(4β→8)-catechin (62)<sup>110)</sup>, prodelphinidin B-1 (63)<sup>111)</sup>, prodelphinidin A-1 (64)<sup>112)</sup>, gallocatechin-(4α→8)-gallocatechin-(4α→8)-gallocatechin (65)<sup>113,114)</sup>であると同定した。

### フラボン配糖体

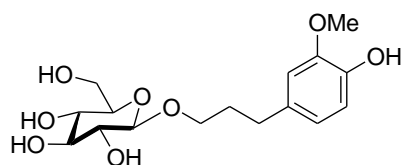


2''-O-rhamnosyl vitexin (38)

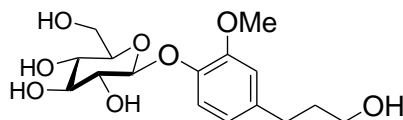
### その他化合物



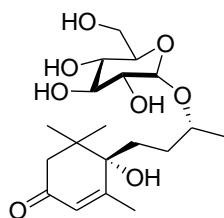
2''-O-rhamnosyl orientin (51)



3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl-β-D-glucopyranoside (52)

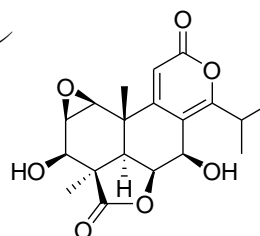


4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenyl-β-D-glucopyranoside (53)



icariside B5 (54)

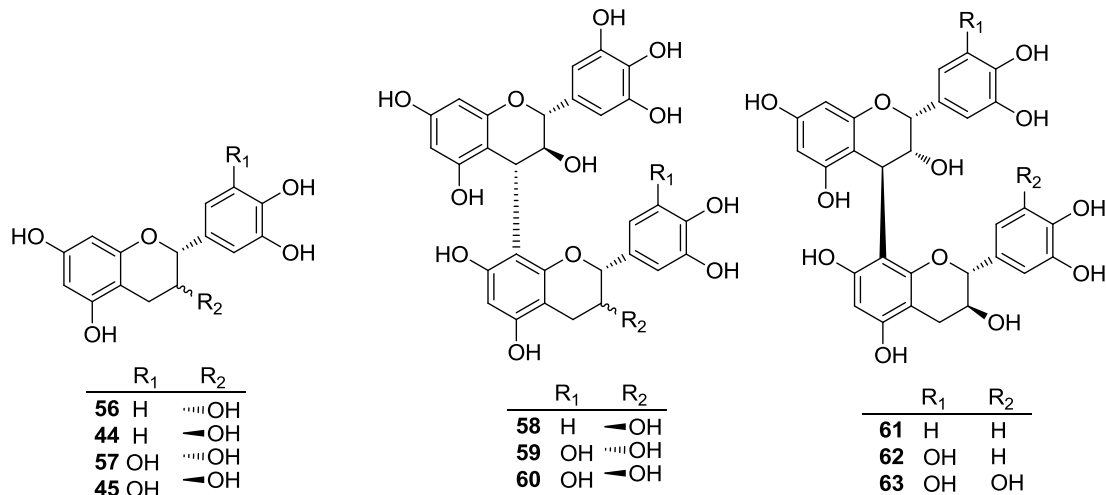
### ラクトン



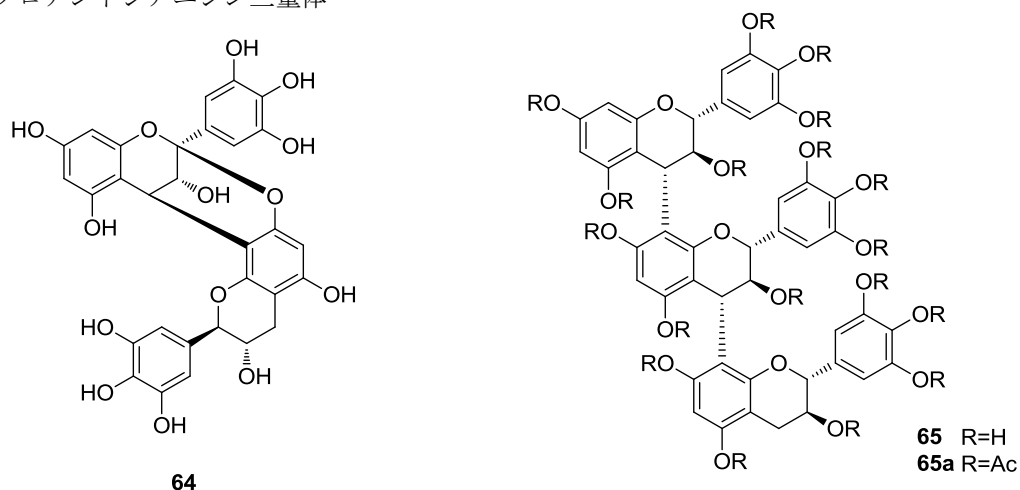
nagilactone C (55)

フラバン-3-オール

プロアントシアニジン二量体



プロアントシアニジン三量体



### 3 新規化合物の構造解析

#### (i) Nagilactone A 1-O-β-D-glucopyranoside (66)

化合物 **66** は, HR-FAB-MS の結果 ( $m/z$  511. 2191,  $[M+H]^+$ ) より, 分子式は  $C_{25}H_{34}O_{11}$  と決定された. また IR スペクトルにおいて  $1767\text{ cm}^{-1}$  に吸収が見られたことより  $\gamma$ -ラクトン環,  $1699, 1627$  および  $1544\text{ cm}^{-1}$  に吸収が見られたことより  $\alpha$ -ピロン環が存在することが分かった. このことは,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルで  $\delta$  181. 6 および  $\delta$  164. 3 にそれぞれ低磁場シフト ( $\gamma$ -ラクトン) および高磁場シフト ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -不飽和ラクトン) したカルボニル炭素シグナルが認められたことから支持された.

$^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおいて  $\delta$  5. 04 に糖アノマー1位水素のダブルットシグナル (7. 8 Hz),  $\delta$  4. 0 ~ 5. 0 に糖由来の水素シグナルが見られ (Table 13), それらの結合定数が多いことからこの糖は D-glucose であることが示唆された. アグリコン部分については,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおいて 19本のシグナルが認められたことから, ノルジテルペンジラクトンであると考えられた.

ノルジテルペンジラクトン部分は,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルを解析した結果 (Fig. 22), nagilactone A<sup>104</sup> と同じ平面構造であると結論した. また, この二次元 NMR スペクトルの解析によって糖は, グルコースであることが支持された.

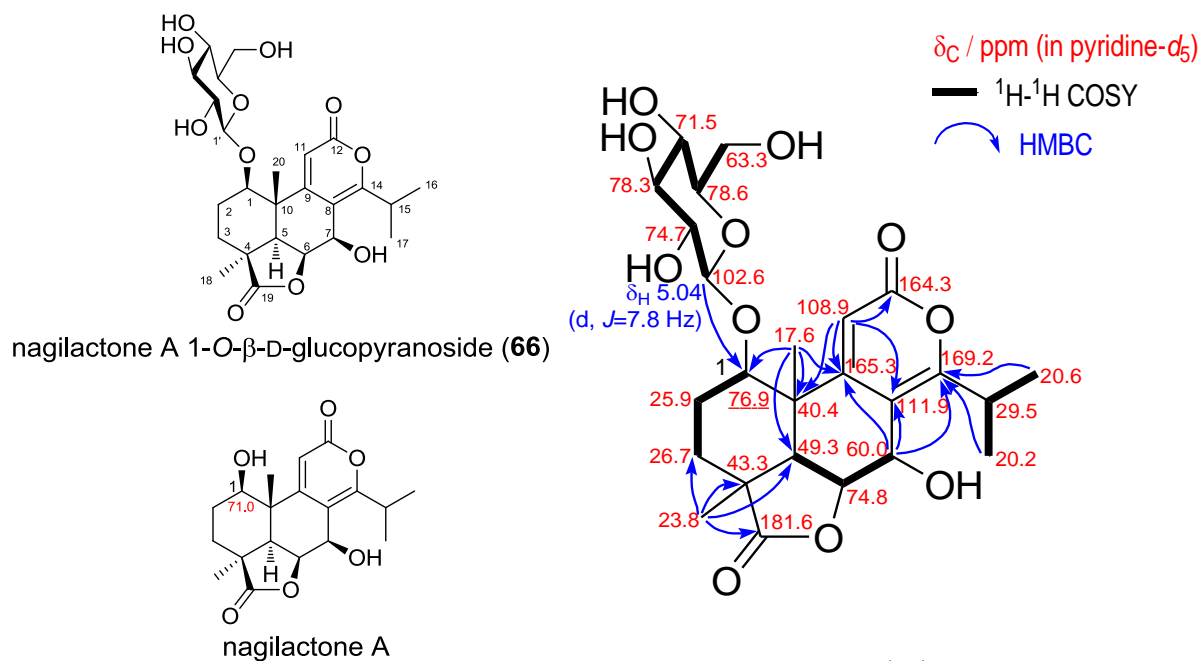


Fig. 22 Important  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations for **66**

Table 13  $^1\text{H}$ - (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$ - (125 MHz) NMR data for **66** ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

Position	<b>66</b>		<b>nagilactone A</b>	
	$^1\text{H}$ ( $J$ , Hz)	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
1	4.32 (dd, 3.3,6.8)	76.9	71.0	
2 $\alpha$	2.22 (m)	25.9	28.0	
2 $\beta$	2.00 (m)			
3 $\alpha$	2.40 (m)	26.7	29.8	
3 $\beta$	1.50 (m)			
4		43.3	43.2	
5	1.70 (d, 6.4)	49.3	50.1	
6	5.10 (dd, 6.4,8.5)	74.8	74.9	
7	5.58 (d, 8.5)	60.0	60.5	
8		111.9	111.9	
9		165.3	169.5	
10		40.4	41.6	
11	8.12 (s)	108.9	108.0	
12		164.3	162.7	
14		169.2	166.0	
15	3.42 (sept, 6.9)	29.5	29.6	
16,17	1.23 (3H, d, 6.9)	20.6	20.2	
	1.20 (3H, d, 6.9)	20.2	20.7	
18	1.31 (3H, s)	23.8	24.6	
19		181.6	181.2	
20	1.82 (3H, s)	17.6	16.1	
1'	5.04 (d, 7.8)	102.6		
2'	4.00 (dd, 8.8,7.8)	74.7		
3'	4.22 (dd, 9.0,8.8)	78.3		
4'	4.12 (dd, 9.4,9.0)	71.5		
5'	4.01 (m)	78.6		
6' $\alpha$	4.65 (dd, 2.4,12.1)	63.3		
6' $\beta$	4.44 (dd, 6.0,12.1)			

Measured in pyridine- $d_5$

グルコースの結合位置は, nagilactone A の 1 位 ( $\delta$  71.0) の  $^{13}\text{C}$ -NMR シグナルが化合物 **66** では低磁場 ( $\delta$  76.9) に, さらに 2 位および 10 位が高磁場にシフトしていたことから, 1 位であると考えられ, このことは, グルコースのアノメリックプロトンと 1 位カーボンとの間に HMBC 相関が認められたことから支持された。

次に相対立体配置については, NOESY スペクトルを解析して決定した. 化合物 **66** のアグリコン部分は, Fig. 23 のように 1' 位と 1 位, 1 位と 5 位, 5 位と 18 位, 5 位と 6 位, 18 位と 6 位, 6 位と 7 位, 7 位と 15 位, および 20 位と 11 位に相関が見られたことから, nagilactone A と同じ相対立体配置であることが分かった (Fig. 23). 絶対配置については後述する。

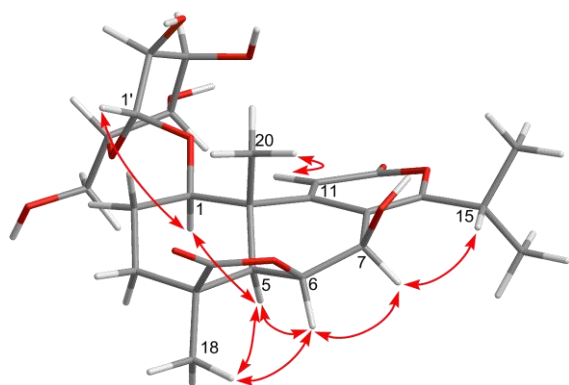


Fig. 23 NOESY correlations for **66**

### (ii) Nagilactone C 7-O- $\beta$ -D-apiofuranoside (**67**)

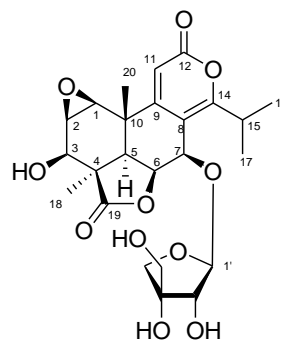
化合物 **67** は, HRFAB-MS の結果 ( $m/z$  511.2191) より, 分子式は  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$  と決定された. IR スペクトルより化合物 **66** と同様に  $\gamma$ -ラクトン環および  $\alpha$ -ピロン環の存在が推定された。

$^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルは既知化合物 nagilactone C (**55**) のものと類似しており, 加えて  $\delta$  5.58 にアノマー水素,  $\delta$  4.0~5.0 に糖由来のシグナルが見られたことから, **67** は **55** の配糖体であることが示唆された (Table 14). また,

FAB-MS において  $m/z$  363 にフラグメントピークが認められ, このピークは  $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5 + \text{H}]^+$  だと推測されたことから, 糖部分は五炭糖と考えられた。

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルを解析した結果, nagilactone C とペントースの存在が裏付けられ, さらにペントースはアピオースであることが明らかとなった (Fig. 24). アピオースの結合位置は, **55** の 7 位の  $^{13}\text{C}$ -NMR シグナルが化合物 **67** では低磁場に, さらに 6 位と 8 位が高磁場にシフトしていることから 7 位であると考えられた. このことは, アピオースのアノメリックプロトンと 7 位カーボンとの間に HMBC 相関が認められたことから支持された. アピオースのアノマー配置については,  $^{13}\text{C}$ -NMR シグナルがメチル  $\beta$ -アピオシドのものとよく類似していたことから  $\beta$  であると決定した<sup>115)</sup>.

化合物 **67** のノルジテルペンジラクトン部分は, 1 位と 2 位, 1 位と 5 位, 2 位と 3 位, 3 位と 18 位, 5 位と 6 位, 5 位と 18 位, 6 位と 18 位, 6 位と 7 位, 7 位と 15 位, および 7 位と 1' 位のプロトン間にそれぞれ NOESY 相関が見られたことから, 化合物 **67** の nagilactone C と同じ相対立体配置を持つことが分かった (Fig. 24).



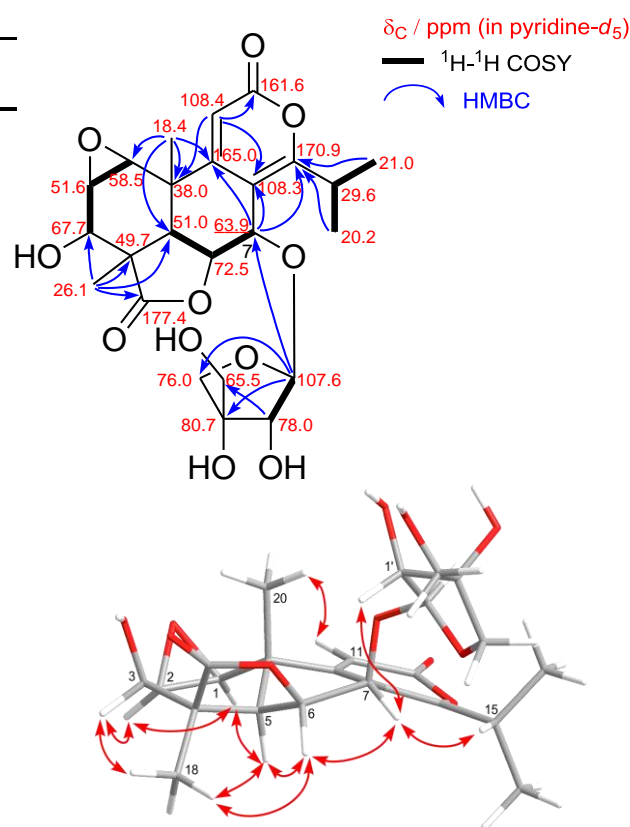
nagilactone C 7-O- $\beta$ -D-apiofuranoside (**67**)

Table 14  $^1\text{H}$ - (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$ - (125 MHz) NMR data

Position	for <b>67</b>		nagilactone C
	$^1\text{H}$ ( $J$ , Hz)	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
1	3.65 (d, 4.3)	58.5	58.1
2 $\alpha$	3.54 (dd, 4.1, 6.0)	51.6	51.5
2 $\beta$			
3 $\alpha$	4.66 (d, 6.0)	67.7	67.9
3 $\beta$			
4		49.7	50.1
5	2.01 (d, 6.9)	51.0	51.2
6	5.14 (dd, 6.9, 8.7)	72.5	73.7
7	5.69 (d, 8.9)	63.9	60.1
8		108.3	111.7
9		165.0	170.3
10		38.0	38.1
11	6.66	108.4	107.2
12		161.6	162.0
14		170.9	165.1
15	3.47-3.53 (m)	29.6	29.6
16,17	1.25 (d, 6.6)	21.0	20.1
	1.12 (d, 6.6)	20.2	20.7
18	1.42	26.1	26.2
19		177.4	177.7
20	1.89	18.4	19.2
1'	5.58 (d, 2.3)	107.6	
2'	4.61 (d, 2.2)	78.0	
3'		80.7	
4' $\alpha$	4.73 (d, 9.4)	76.0	
5' $\alpha$	4.19 (d, 11.4)	65.5	

Measured in pyridine- $d_5$ 

次に、化合物 **66** と **67** の絶対構造について検討を行った。 **66** と **67** の糖部分の絶対構造については、それぞれを酸加水分解後、L-システインメチルエステルおよび  $\alpha$ -トリルイソチオシアネートと順次反応させてチオカルバモイル-チアゾリジン誘導体に変換し、HPLC で標品と保持時間を比較することにより決定した (Chart 5-4)<sup>43</sup>。化合物 **66** から得たグルコースの誘導体は、 $t_R = 18.7$  min に検出され、D-glucose ( $t_R = 18.7$  min)、および L-glucose (17.2 min) の標品から合成した誘導体と比較して D-glucose であると決定した。また、化合物 **67** から得たアピオースの誘導体は、 $t_R = 31.3$  min に検出され、D-アピオースの誘導体 ( $t_R = 31.0$  min)、および L-アピオースの誘導体 ( $t_R = 16.8$  min) の  $t_R$  値と比較して D-アピオースであると決定した。

Fig. 24 Important  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC correlations and configuration for **67**

次に、アグリコン部の配置を決定するため、化合物 **55**, **66** および **67** の CD スペクトルを測定した。 **66** および **67** はいずれも、既知化合物である nagilactone C (**55**) とよく似た Cotton 効果を示したことから (Fig. 25)、アグリコン部分は **55** と同じ絶対構造であると結論した。

以上の検討により、**66** および **67** の絶対構造を決定した。

以前、イヌマキと同じマキ科マキ属のナギから、化合物 **66** と同じ化学構造を持つ nagilactoside B が単離され、Xu らによって 1993 年に報告されている<sup>94</sup>。しかし、その NMR スペクトルは **66** のものとは一致しなかった。Nagilactoside B は加水分解、 $^1\text{H}$ -NMR および  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY の解析のみから構造決定されていることから、nagilactoside B の構造は間違いであることが示唆された。

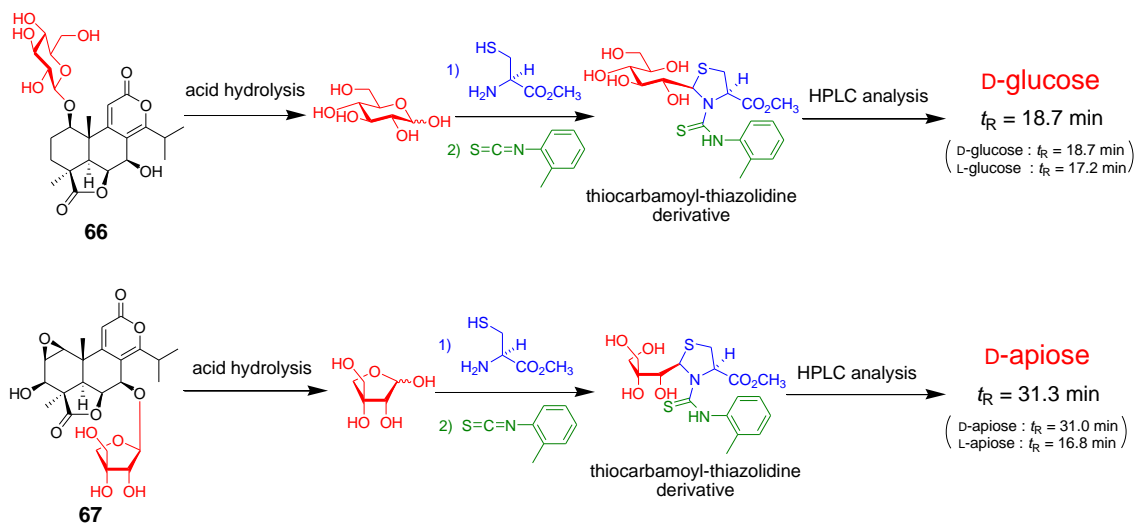


Chart 5-4 Determination of absolute configuration of sugar moiety (**66** and **67**)

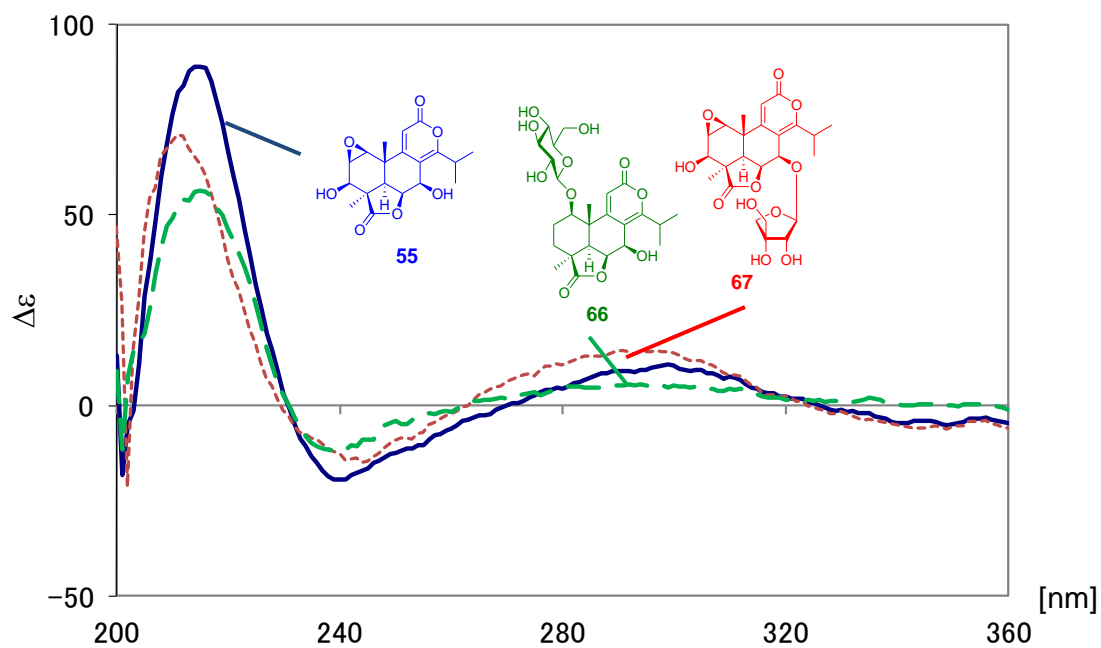


Fig. 25 CD spectra for **55**, **66** and **67**

#### 4 果実に含まれるプロアントシアニジン類の構造解析

種子抽出エキスの水可溶部から得られた Fr. IGW24 の分画はプロアントシアニジンオリゴマー

であり、収量も他の物質に比べて比較的多かったことから (Chart 5-3), その化学構造の解析を行った。

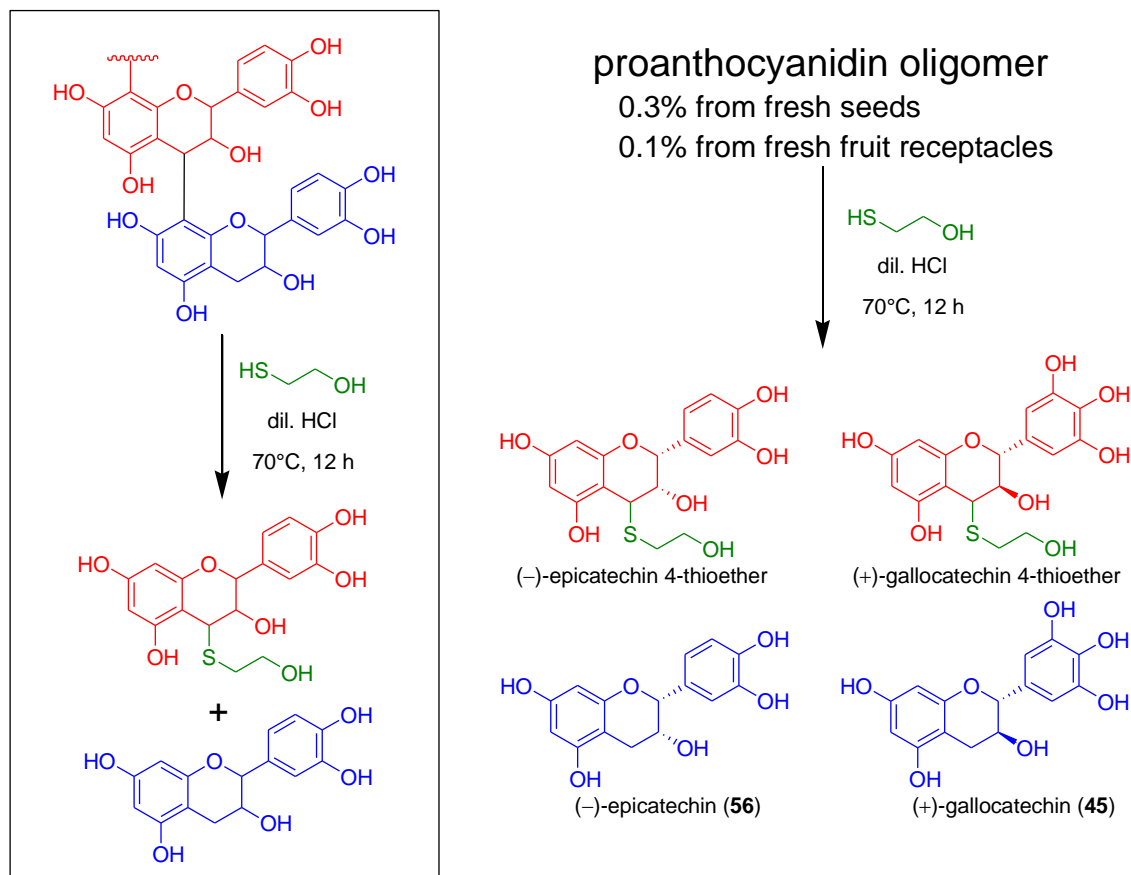


Chart 5-5 Thiol degradation of proanthocyanidin oligomers

プロアントシアニジンは、酸性条件下で、チオール類と共に加熱すると、フラバン 3-オールの構成ユニットに断片化することができる (Chart 5-5)<sup>116)</sup>。

そこで、種子プロアントシアニジンオリゴマー (IGW24) について、メルカプトエタノールを用いてチオール分解した結果、主にエピカテキン、ガロカテキンおよびこれらのチオエーテルが生成した

(Fig. 26)。また、種子プロアントシアニジンオリゴマー (IGW24) の <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定し解析した結果、カテコール型およびピロガロール型カテキン由来のシグナルが認められた (Fig. 27)。

以上のことから、種子プロアントシアニジンオリゴマー (IGW24) は、エピカテキンとガロカテキンを主な構成ユニットとしていることがわかった。

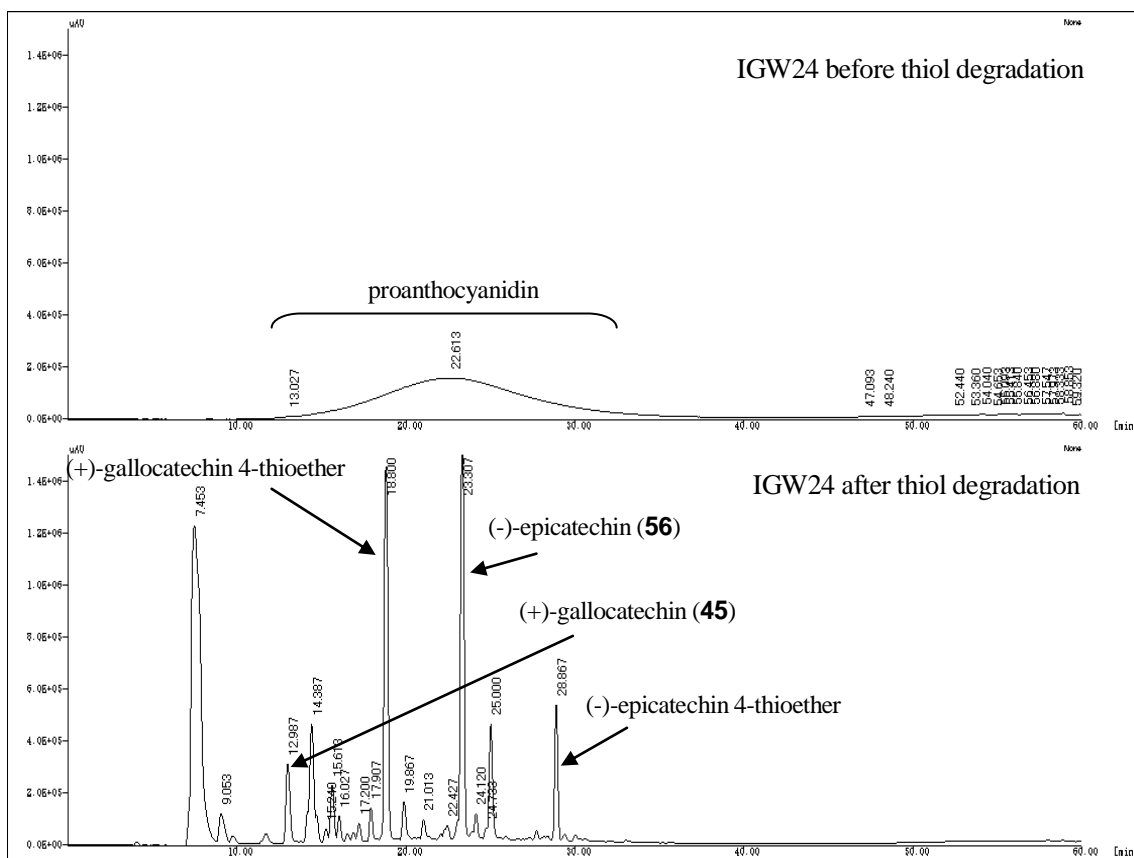


Fig. 26 HPLC analysis of thiol degradation products of seed proanthocyanidin oligomers

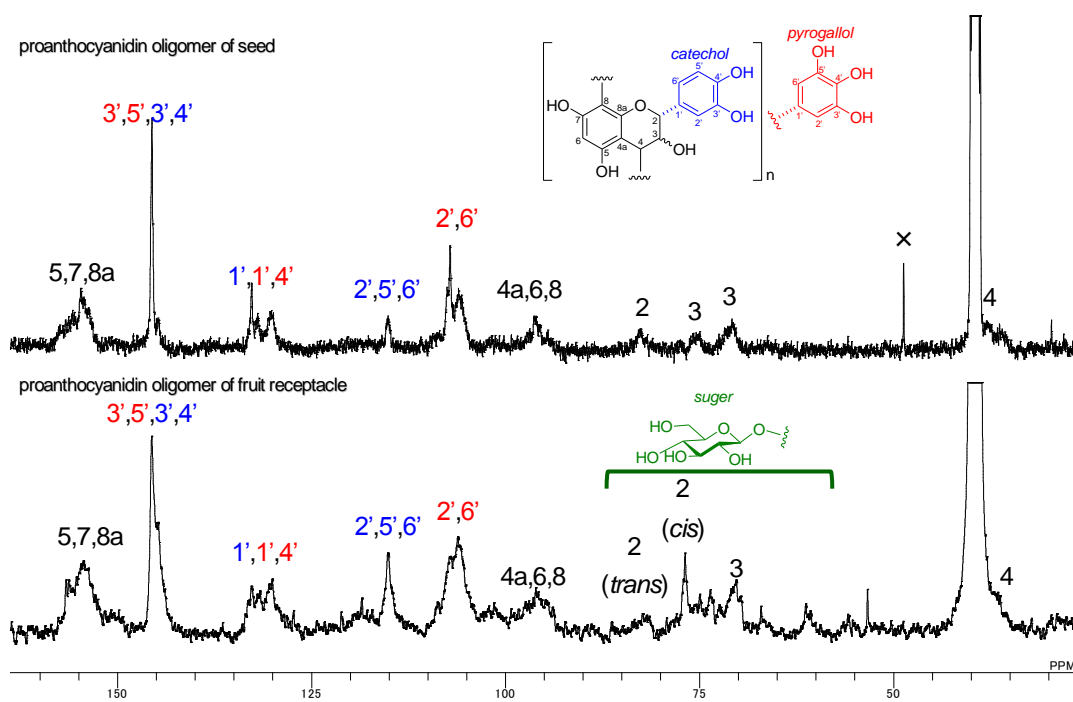


Fig. 27  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra for proanthocyanidin oligomers of seed and fruit receptacle



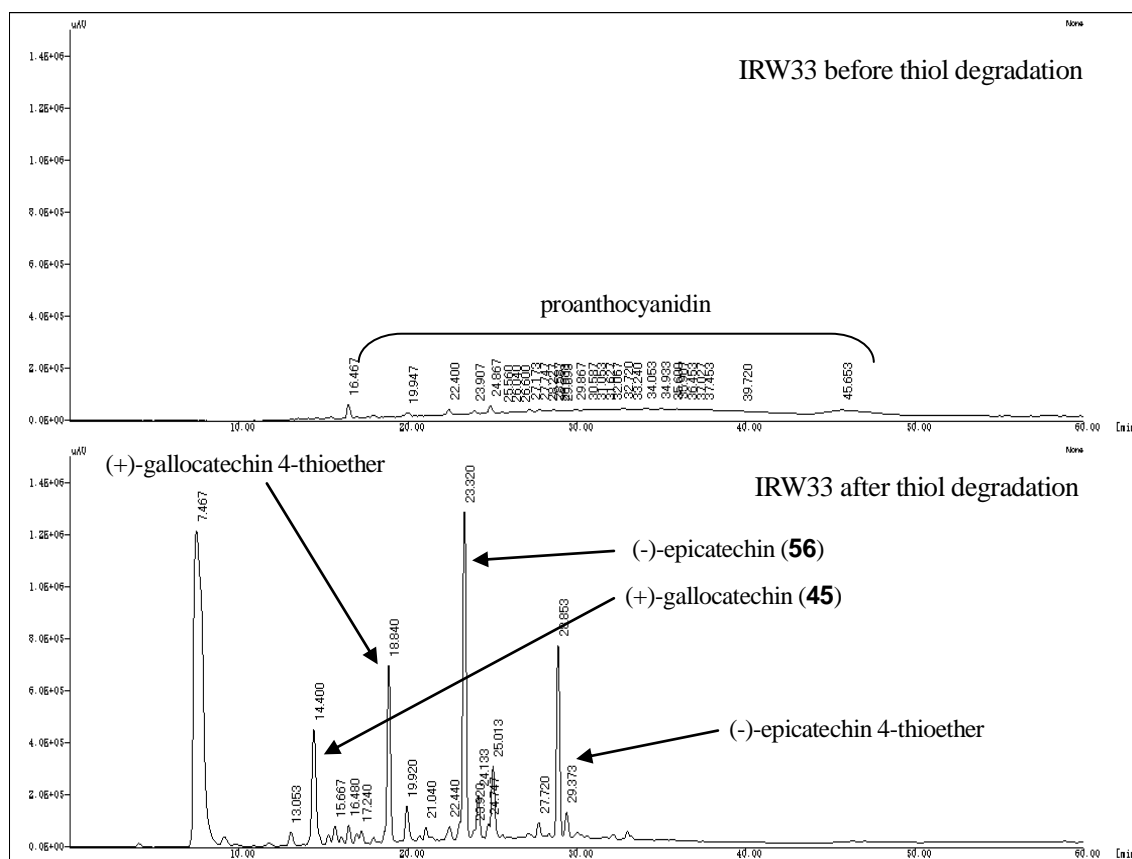


Fig. 28 HPLC analysis of thiol degradation products of proanthocyanidin oligomers obtained from fruit receptacle

さらに、果托抽出エキスより得たプロアントシアニジンオリゴマー (Fr. IRW33) についても、同様に検討した結果、種子と同様にエピカテキンとガロカテキンを主な構成ユニットとしていることがわかった (Fig. 28)。しかし、果托プロアントシアニジンオリゴマーの  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルからは、種子では見られなかった糖に由来すると考えられるシグナルが観察された (Fig. 27)。このことは、果托プロアントシアニジンオリゴマーの一

部に、どのような様式で結合しているのかは不明であるが、糖が結合したユニットが存在していることを示唆している。

次に、種子および果托プロアントシアニジンオリゴマーの MALDI-TOF-MS スペクトルの測定を行った。その結果、種子プロアントシアニジンオリゴマー (IGW24) にはフラバン-3-オール 4 量体から 14 量体までが含まれていることが分かった。

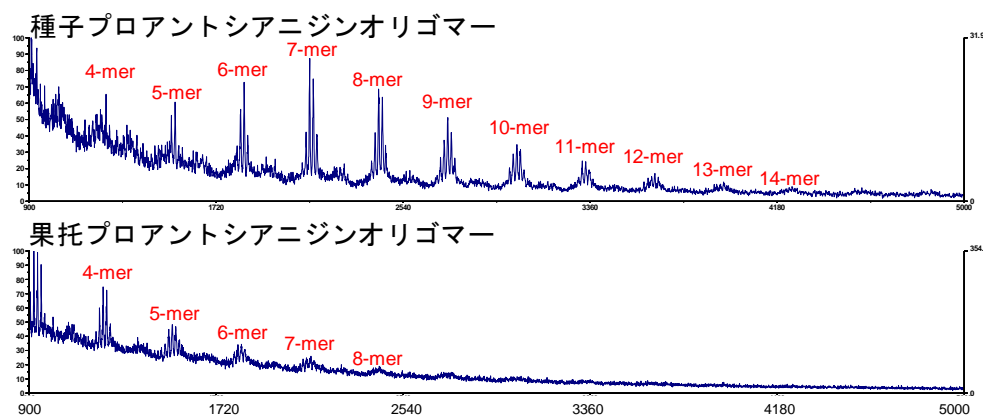


Fig. 29 MALDI-TOF-MS spectra for proanthocyanidin oligomers of seed and fruit receptacle

一方、果托プロアントシアニンオリゴマー (IRW33) については、4 量体から 8 量体に相当するピークが検出された (Fig. 29).

以上の検討により、種子および果托のプロアントシアニンオリゴマーの構造は Fig. 30 のように推定された。

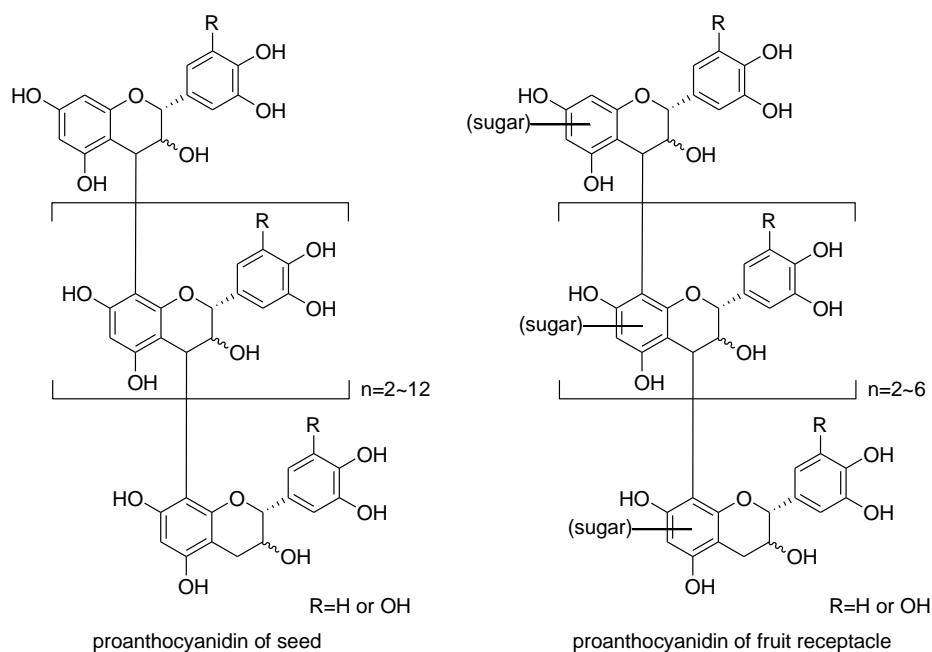


Fig. 30 Proposed structure of seed and fruit receptacle proanthocyanidins

## 5 小括

イヌマキ果托より、3種のアントシアニン、3種の新規化合物を含む8種のフラボン C-配糖体、1種のフラボノール、2種のフラボノール配糖体、3種のフラバン-3-オール類および1種の新しいノルセスキテルペンを単離した。また、この他に多量の糖類が含まれていた。最も多く含まれていたアントシアニンである cyanidin

3-*O*-β-D-glucoside は、近年様々な活性について報告されている機能性色素である。

今回、果托の成分について精査した結果、樹皮、材から単離されている細胞毒性が強いノルジテルペンジラクトン類は検出されず、新たに単離したノルセスキテルペンについても新鮮な果托の 0.0009%と極微量であった。これまで果托は生食のほか果実酒などに加工され、食用として利用されていたことから、本研究で多くの機能性ポリフェノールの存在が明らかになったことをふまえて、今後さらに食用資源としての展開が期待できる。

これまで、含有成分が明らかとされていなかったイヌマキ種子からは、2種のフェニルプロパノイド配糖体、1種のメガスチグマン配糖体、3種のフラボン C-配糖体、1種のノルジテルペンジラ

クトンおよび2種の新しいノルジテルペンジラクトン配糖体が得られた。

豊富に含まれていたプロアントシアニン成分について詳細な検討を行った結果、イヌマキ種子より、4種のフラバン-3-オール類、8種のプロアントシアニン類が得られた。また、イヌマキ種子および果托に含まれるプロアントシアニンオリゴマーは、主にカテコール型およびピロガロール型カテキンから構成されていることがわかった。種子プロアントシアニンオリゴマーにはカテキン4量体から14量体までが、果托プロアントシアニンオリゴマーには4量体から8量体に糖が結合したものが含まれていることが明らかとなった。

イヌマキの果托には、イヌマキの材、樹皮および種子から単離されているノルジテルペンジラクトンが単離されず、糖類や生理活性色素である cyanidin 3-*O*-β-D-glucoside を多く含むことが明らかとなり、今後の利用が期待できる。また、種子に強い細胞毒性を有するノルジテルペンジラクトン類が含まれていることを初めて明らかにした。種子は有毒といわれているが、これらがその原因物質であると考えられる。

## 第7章 シイタケ栽培条件の違いによる eritadenine 含有量の変化

### 1 シイタケの菌床栽培と eritadenine について

シイタケ (*Lentinula edodes*) は、菌床栽培 (Chart 6-1) により通年生産が可能になり、常時食卓にのぼるキノコである。長崎県の菌床シイタケ生産量は全国6位であり、地域の基幹産業として重要である。近年、菌床栽培に用いる木材のチップについて、生産量の増加および地域間での獲得競争により、持続的な供給体制の構築が求められている。現在、菌床栽培に用いる木材については地域の資源を活用することも検討されており、様々な樹種を用いたときの発生量について検討されているところである。しかし、シイタケの有する機能性物質についてどのような変化があるかは検討されていない。シイタケは、血漿コレステロール低下作用がある eritadenine (68) [2(R), 3(R)-dihydroxy-4-(9-adenyl) butyric acid] を含有することが知られている<sup>117-120)</sup>。すでに68の含有量が多い菌株の選抜は行われ<sup>121)</sup>、また、栽培時の温度条件により含有量が変化することが報告

されている<sup>122)</sup>。ヒメマツタケ<sup>123)</sup>やブナシメジ<sup>124)</sup>など他のキノコ類では培地成分と含有成分について検討されているが、シイタケ栽培に用いる培地基材と68の含有量の関係については検討されていない。そこで、本章ではシイタケ栽培に用いるチップの原料を地域資源の中から探索するため、チップの原料とシイタケに含まれる eritadenine (68) 含有量について検討した。

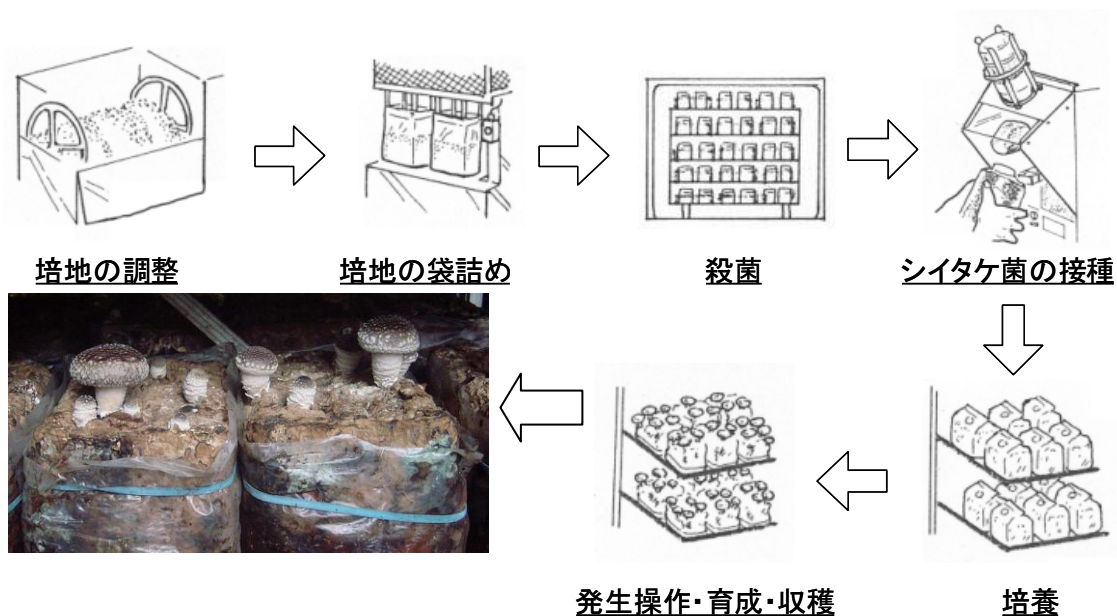
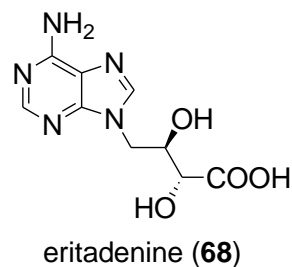


Chart 6-1 シイタケの菌床栽培<sup>125)</sup>

## 2 Eritadenine の単離

Eritadenine (68) の標品は販売されておらず、検量線を作成するためにはシイタケから 68 を単離する必要がある。そこで、68 の標準品を齊藤ら<sup>126)</sup>の方法を一部改変して分離した (Char 6-2)。分離・精製法を改良する過程で 68 の分離に親水性相互作用 (HILIC) クロマト担体であるアミノプロピル化シリカゲル (Chromatorex NH) が有効であることを初めて明らかにした。得られた 68 は TLC, UV 吸収 (260nm)<sup>127)</sup> および <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを文献値<sup>128-131)</sup>と比較することにより同定した。

68 の HPLC 分析には、トリアゾール結合型シリカゲルである Cosmosil HILIC カラムが有効であることを見出し、本実験での分析に応用した。

また、シイタケ粉末から熱水抽出したサンプルを Cosmosil HILIC カラムを用いて HPLC 分析に供した結果、68 はシイタケの旨味成分である guanosine monophosphate (グアニル酸) や他の成分との保持時間が異なり、単独で検出することができた (Fig. 31)。このことからシイタケの熱水抽出物を用いて分析を進めた。

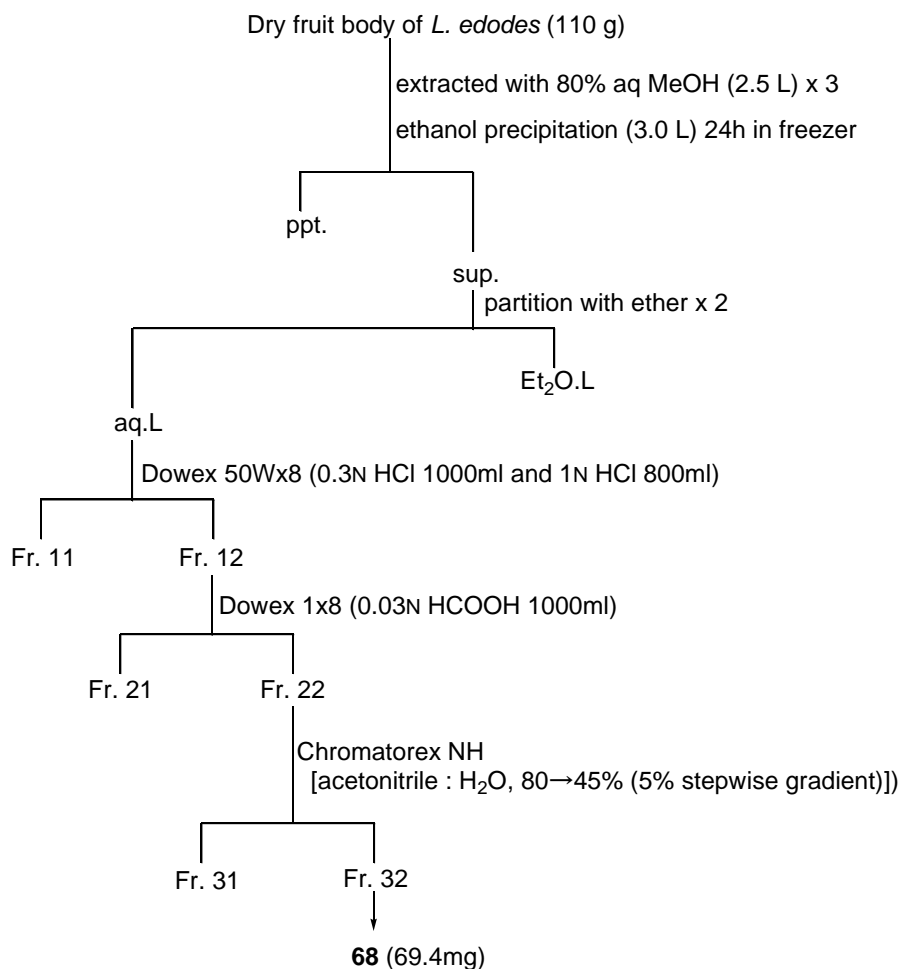


Chart 6-2 Extraction and fractionation

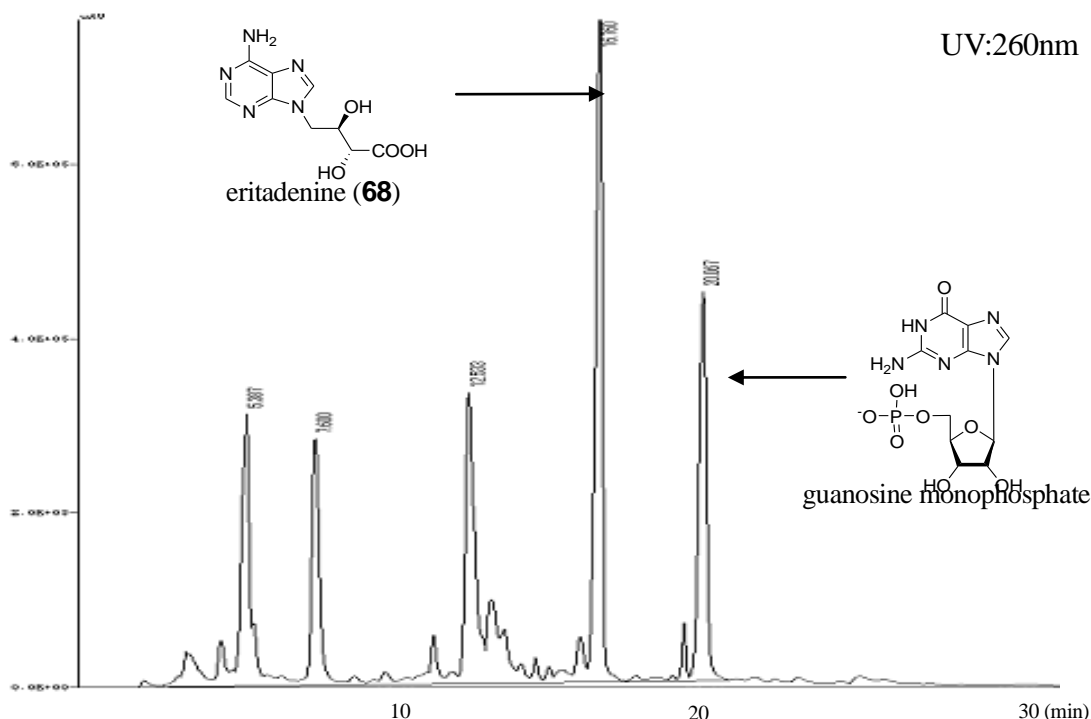


Fig. 31 Separation of eritadenine by HPLC

### 3 異なる樹種のチップで栽培したシイタケの eritadenine 含有量

#### 1) シイタケ栽培の条件

チップの原料には、アラカシ、クヌギ、スダジイ、タブノキ、マテバシイ、サクラおよびクロキそれぞれをチップーシュレッダーで4mmに粉砕したものを用いた。

菌床栽培は、長崎県南島原市にある(有)ナガハシにおいて、北研600号の種菌を用いて行った。シイタケ菌の培養及び発生操作については、樹種ごとに粉砕してチップとし、3日間散水後、菌床栽培用ブロックに成形した。120℃で滅菌、放冷後、種菌を接種し、90日間培養後、発生したものを採集した。

#### 2) Eritadenine の抽出条件の検討

シイタケに含まれる eritadenine を抽出し定量する場合、抽出条件によって結果が異なるかどうか検証した。

サンプルは乾しいたけ傘部を粉末化したものを使用した。抽出条件は、容器の形状、サンプルの重量および分注する H<sub>2</sub>O の容量の3条件について

4種類の組み合わせに (Table 15)について検討し、100℃, 30minで熱水抽出した。抽出は1サンプルずつ行い、4反復の繰り返し実験を行った。抽出液は、ろ過後、HPLCに供し、検量線 (Fig. 32) を用いて含有量を算出した (決定係数: 0.9991)。

測定値を eritadenine 含有量 (mg/ml) に換算した値を用いて分散分析を行った結果、抽出条件によって定量結果に有意差はなかった (Table 16: P > 0.05; Fig. 33)。この結果から、今後の分析では、200 mg / 8 ml の条件により、定量を行うこととした。

Table 15 Eritadenine (68) の抽出条件

条件	反応容器	シイタケ (mg)	H <sub>2</sub> O (ml)	反復
I	マイティバイアル No.3	100	4	4
II	マイティバイアル No.3	200	4	4
III	マイティバイアル No.5	200	4	4
IV	マイティバイアル No.5	200	8	4

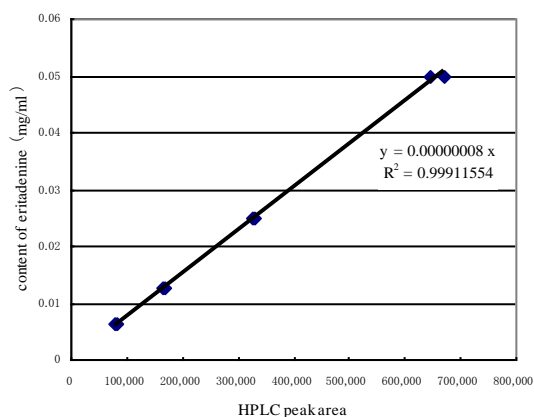


Fig. 32 Standard curve of eritadenine (68)

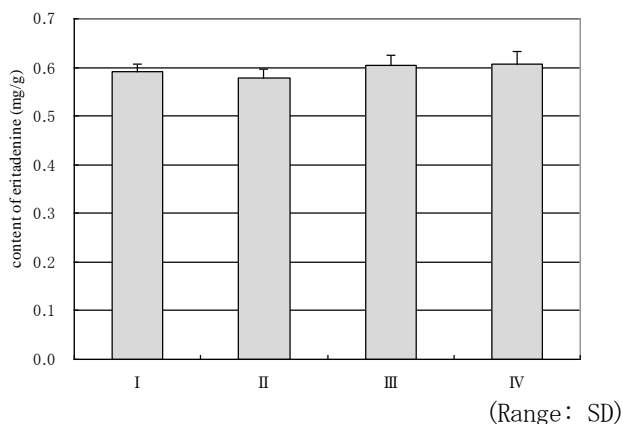


Fig. 33 異なる抽出条件による eritadenine (68) の抽出状況 (Range: SD)

Table 16 異なる抽出条件による eritadenine (68) 定量結果

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	0.002018042	3	0.00067268	0.428316242	0.7364025	3.49029482
グループ内	0.018846281	12	0.00157052			
合計	0.020864324	15				

### 3) 異なる栽培条件下での eritadenine 含有量の比較

各菌床ブロックから得た子実体の傘部 200 mg を 8 ml の H<sub>2</sub>O で 30 min 熱水抽出した。抽出液は、Cosmosil HILIC カラムを用いた HPLC 分析に供し、検量線を用いて含有量を算出した。

各栽培条件下での eritadenine 含有量を比較した結果、分散分析において樹種間に差異が認められた (Table 17; P<0.01)。各樹種間での有意差を検定するために、Holland-Copenhaver の方法<sup>132,133)</sup>により平均値の差の検定を行った結果 (Table 18)、クロキを用いた場合は有意に含有量が少なかった。また、タブノキを用いた場合、eritadenine 含有量が多くなる傾向が認められた (Fig. 34)。

今回の結果から、使用するチップによって eritadenine (68) の含有量が異なることが示唆された。今回の実験でのシイタケの収穫量と 68 の含有量については、68 の含有量が多かったタブノキはシイタケの収穫量も多かったが、一方、68 の含有量が少なかったクロキでは収穫量も少なかった。今回は 7 樹種のみでの評価であるが、長崎県内には平戸地域のマテバシイなど他にも地域資源として活用可能な樹種が存在する。今後、シイタケ栽培に適した樹種の選定を進めることと合わせて、機能性物質の含有量を評価し付加価値を高めることで、これまでシイタケ栽培に使用しなかった地域資源の活用につながるものと期待される。

Table 17 各樹種のチップで栽培したシイタケの eritadenine 含有量の分散分析

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	0.0037279	6	0.0006213	7.0745214	0.0003182	2.5727116
グループ内	0.0018443	21	0.0000878			
合計	0.0055722	27				

Table 18 Eritadenine 含有量の平均値の差の検定

樹種	アラカシ	クヌギ	スダジイ	タブノキ	マテバシイ	サクラ	クロキ
アラカシ	—	1.000	1.000	0.997	0.906	1.000	0.019
クヌギ		—	1.000	0.872	1.000	1.000	0.369
スダジイ			—	0.852	1.000	1.000	0.035
タブノキ				—	0.595	0.980	0.062
マテバシイ					—	0.997	0.021
サクラ						—	0.039
クロキ	*		*		*	*	—

n=4, \*: 5%有意

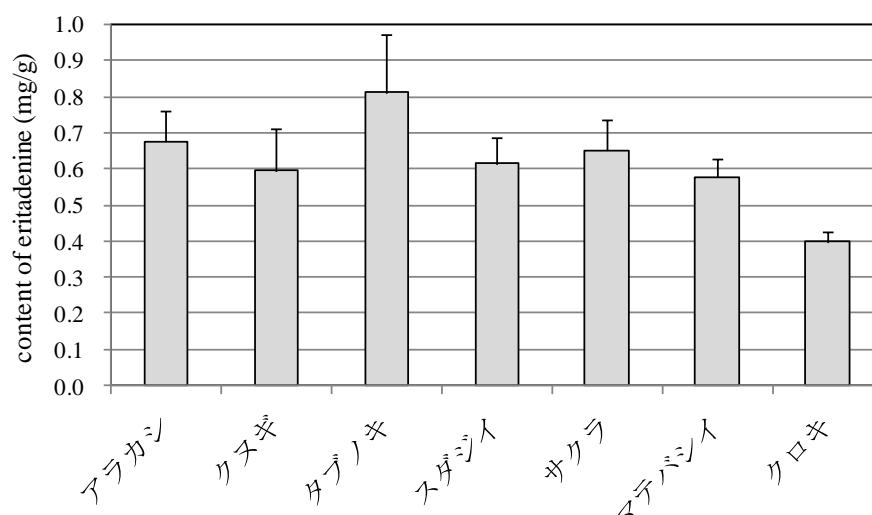


Fig. 34 シイタケ栽培に用いた樹種別の eritadenine 含有量

#### 4 小括

シイタケ栽培は樹木の丸太をそのまま使う原木栽培と丸太を粉砕してチップとして用いる菌床栽培がある。近年、温度や湿度の管理を行うことで通年出荷可能な菌床栽培が増えてきており、そのために使用する木材チップを継続的に確保していくことが求められている。このため、どのような木材チップを使用するのかについては、検討の必要性がある。今回、シイタケの機能性物質である eritadenine (68) について、異なる樹種のチップを用いた場合について評価した。

まず、eritadenine (68) の定量を行うため、抽

出条件および HPLC 分析について条件検討し、HILIC モードを適用した新たな eritadenine 定量法を開発した。

シイタケ栽培の条件における培地基材に用いる木材チップが、eritadenine 含有量に変化を及ぼすかどうか検討した結果、今回使用した7樹種の中では、タブノキを使用した場合に含有量が最も多く、クロキを使用した場合に最も少なくなった。

今後、シイタケ栽培に使用する樹種については、シイタケの発生量だけでなく、機能性物質による付加価値も含めて検討することで、業界への支援が期待できる。

## 第8章 総括

本研究では、長崎県の森林資源の中から機能性物質を探索するため、総ポリフェノール含量の評価を行い、その結果をもとに、香木の原料であるクルミ科のノグルミの材、今まで成分について検討されていないミツバウツギ科のゴンズイの葉および樹皮、様々な機能性物質が報告しているウルシ科ヌルデ属の中でフェノール成分について詳細な検討がされていないヤマハゼの材について成分を精査した。次に、平戸地域に広く自生し、一部食用として利用されているマキ科のイヌマキの果托と種子についても機能性物質の有無を検討した。最後に、長崎県の主要産物であるシイタケが含有する機能性物質 eritadenine の含有量が培地基材に用いる樹種を変えた場合どのように変化するかを検討した。

第2章では、森林資源に含まれるポリフェノール含量を評価した。多様な環境に面した長崎県の森林には、61科268種の植物が存在しているが、その中で資源として重要と思われる26科35属46種を対象とした。総ポリフェノール含量が多かったサンプルについてTLCおよびHPLC分析を行った結果、ツブラジイとコナラの樹皮はプロアントシアニジンとエラジタンニン、ホルトノキの材はガロタンニン類、ヤマモモの樹皮はプロアントシアニジンとフラボノール配糖体、ノグルミの葉はエラジタンニン、ヤマハゼの材はガロタンニンとフラボノイド類を主に含むことが明らかになった。また同一種であっても、材や葉、樹皮など組織部位によって含有成分が異なる。そこで、総ポリフェノール含量を組織部位ごとに比較した結果、ゴンズイでは材の含有量が少なく、ヤマモモでは樹皮に多量のポリフェノールを含有し、アベマキでは材や樹皮より葉にポリフェノールを多く含んでいた。

このように、長崎県に生育する多くの植物について、抗酸化作用などの生理活性が期待されるポリフェノールの基礎資料を蓄積していくことで、今後、地域資源の活用にも有用な情報となるものと期待される。

第3章では、焼くことで香気を発し、かつて沈香のかわりに使用されていたノグルミの材に含ま

れる揮発性成分および熱処理前後の成分変化について検討した。まず、第1章で確認されたノグルミの材の脂溶性成分について検討した結果、既知化合物1種と2,4-cyclohexadiene 骨格を有する3種の新たなセスキテルペン **2** ~ **4** を得た。ノグルミの材は加熱すると香気を発するため、加熱した時の煙を分析した結果、セスキテルペン **4** の存在を確認した。

次に、ノグルミの材を熱処理した前後で含有成分がどのように変化するか検討した。その結果、17種の既知化合物 **5** ~ **21** および2種の新規化合物 **22**, **23** を得た。熱処理することで、エラジタンニン類が分解し、ガロタンニン類は変化がなかった。また、coniferylaldehyde (**14**), sinapylaldehyde (**15**), vanillin (**16**), syringaldehyde (**17**), (-)-episyngaresinol (**20**), *m*-および *p*-digallic acid (**21**) は熱処理により新たに生成した化合物である。焼いた時の香りには、**16** の甘い香りのほか、香りの中に存在が確認された **4** が関与していると考えられた。

ノグルミは香木として利用可能であり、対馬地域に広く自生することから、資源の活用につなげていきたい。

第4章では、第2章で葉や樹皮にポリフェノールを多量に含んでおり、これまで成分について検討されていないゴンズイについて検討した。ゴンズイの葉の主成分は、1( $\beta$ )-*O*-galloyl pedunculagin (**11**) であり、新鮮重量の1.28%と極めて高い含有率であった。また、新規化合物として **11** の二量体である化合物 **24** を得た。また、樹皮の主成分は、3,3'-*O*-methyl ellagic acid (**25**) であり、葉とは異なる成分であった。

ゴンズイの葉の主成分である **11** には、キナーゼ阻害活性が報告されており、ゴンズイの葉は **11** を大量に含有し、かつ精製が容易であることから、**11** の原料として有用と考えられる。

第5章では、総ポリフェノール含量が多く、今まで検討されていないヤマハゼの材について検討した。黄色のヤマハゼの心材では、fustin (**26**) が主成分であり、**26** にガロイル基が結合した2種の新規化合物 3-*O*-galloyl fustin (**31**) および



3' (4')-*O*-galloyl fustin (**32**)を単離し、構造決定した。

ウルシ科ヌルデ属の植物では、様々な生理活性の評価が行われている。近年、抗酸化活性の評価手法として標準化されつつある ORAC 法によりヤマハゼの心材成分の抗酸化活性を評価した結果、gallic acid (**6**)と比較して、**26**, 2, 3', 4', 6-tetrahydroxy-2-benzylcoumaranone (**28**), **31** および **32** のいずれもが高い抗酸化活性を示した。ヤマハゼは特に **26** の含有量が多く、資源として豊富であることから、**26** の原料として利用可能である。

第6章では、平戸地域に多く自生するイヌマキの果托と種子について検討した。果托は食用可能であるが、種子は有毒とされている。しかし、果托と種子について、これまで成分に関する報告はない。

イヌマキ果托より、3種のアントシアニン、3種の新規化合物 **48** ~ **50** および既知化合物5種のフラボン *C*-配糖体、1種のフラボノール、2種のフラボノール配糖体、3種のフラバン-3-オール類および1種の新しいノルセスキテルペン podomacrin A (**47**)を単離した。また、この他に多量の糖類が含まれていた。今回、樹皮および材に含まれる細胞毒性の強いノルジテルペンジラクトン類は果托からは検出されず、新たに単離した **47** についても新鮮な果托の0.0009%と極微量であった。これまで果托は生食のほか果実酒などに加工され、食用として利用されていたことから、本研究で多くの機能性ポリフェノールの存在が明らかになったことをふまえて、今後さらに食用資源としての展開が期待できる。

次に、有毒とされるイヌマキ種子について検討し、2種のフェニルプロパノイド配糖体、1種のメガスチグマン配糖体、3種のフラボン *C*-配糖体、1種のノルジテルペンジラクトン **55** および2種

の新しいノルジテルペンジラクトン配糖体 **66**, **67** が得られた。**55** は強い細胞毒性を有することから、種子が有毒と謂われる原因物質であると考えられる。

豊富に含まれていたプロアントシアニジン成分について詳細な検討を行った結果、イヌマキ種子および果托に含まれるプロアントシアニジンオリゴマーは、主にカテコール型およびピロガロール型カテキンから構成されていることがわかった。また、種子プロアントシアニジンオリゴマーにはカテキン4量体から14量体までが、果托プロアントシアニジンオリゴマーには4量体から8量体のものに糖が結合したものの存在が明らかとなった。

第7章では、近年、通年出荷可能となったシイタケの菌床栽培において、その機能性物質である eritadenine (**68**)が、異なる樹種のチップを用いた場合にどのように変化するかについて検討した。

まず、**68** の定量を行うため、抽出条件および HPLC 分析について条件検討し、新たな eritadenine 分離法および定量法を開発した。次に、シイタケ栽培の条件における培地基材に用いる木材チップが、eritadenine 含有量に変化を及ぼすかどうか検討した結果、今回使用した7樹種の中では、タブノキを使用した場合に含有量が最も多く、クロキを使用した場合に最も少なかった。

今後、シイタケ栽培に使用する樹種については、シイタケの発生量だけでなく、機能性物質による付加価値も含めて検討することで、業界への支援が期待できる。

以上のように、長崎県の森林に生育する植物から機能性物質を探索する研究を行った。現在、化石燃料や代替資材の台頭により利用されなくなった森林資源を活用していくためには、既存の利用法だけでなく、機能性物質を活用した新たな用途開発も必要と考えている。長崎県内の森林資源が有効に活用されるよう今後も尽力していきたい。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 河野 功 名誉教授に衷心よりお礼申し上げます。

併せて、本研究の計画、実験、考察に懇切な御指導および御助言をいただきました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 田中 隆 教授に心から感謝致します。

また、本学への進学にあたり、多大な御配慮をいただきました長崎県科学技術振興局 中村 修 局長、稲田雅厚 理事、並びに長崎県農林技術開発センター 江頭正治 センター所長、久林高市 森林研究部門長、ほか長崎県の関係職員に感謝いたします。

さらに、本研究で数々の御協力をいただきました本学医歯薬学総合研究科 山田耕史 准教授、並

びに本学医歯薬学総合研究科 松尾洋介 助教、本学天然物化学研究室の諸氏に感謝致します。また、シイタケのサンプルを提供して下さった(有)ナガハシの 森内泰樹 氏、CDスペクトルの測定に御便宜をいただいた本学医歯薬学総合研究科 田中正一 教授、並びに核磁気共鳴スペクトル、質量分析スペクトル及び元素分析を測定して頂いた本学共同研究交流センター先端科学研究支援部門の 稲田勝博 氏、山口憲昭 氏、津田信明 氏に感謝致します。また、実験の一部を担当して下さった 織部智子 修士、綾部奈美、鹿子木成美、佐藤 光、國平雄士および古賀裕基 学士に感謝致します。

最後に暖かい支援をしてくれた家族、多くのお世話になった方々に深く感謝いたします。

## 実験の部

$^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルは Varian Unity plus 500 spectrometer ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz), JEOL JNM-AL400 spectrometer ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz) で測定した. ケミカルシフトは溶媒ピーク (acetone- $d_6$ :  $\delta_{\text{H}}$  2.04,  $\delta_{\text{C}}$  29.8;  $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $\delta_{\text{H}}$  3.30,  $\delta_{\text{C}}$  49.0; DMSO- $d_6$ :  $\delta_{\text{H}}$  2.49,  $\delta_{\text{C}}$  39.7) を基準とする  $\delta$  値 (ppm) で表し, 結合定数  $J$  は Hz で表した. シグナルの表示は次の略号で示した (s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, dd: double doublet, m: multiplet, br: broad).

FAB-MS は JOEL JMS-700N mass spectrometer で測定した. マトリックスは glycerol または *m*-nitrobenzyl alcohol を用いた.

MALDI-TOF-MS は Applied Biosystems Voyager-DE PRO で測定し, マトリックスは 2,5-dihydroxybenzoic acid または  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/ml in 50% acetone containing 0.05% trifluoroacetic acid) を用いた.

HR ESI-TOF MS は, JOEL JMS-T100TD で測定した.

元素分析は Perkin-Elmer 2400 II analyzer を用いて測定した. IR スペクトルは JASCO FT/IR-410 spectrophotometer, UV スペクトルは JASCO V-560 spectrophotometer, 旋光度は JASCO P-120 digital polarimeter, CD スペクトルは JASCO J-725 で測定した.

カラムクロマトグラフィーは Diaion HP-20 及び MCI gel CHP 20P (Mitsubishi Chemical Co.), Sephadex LH-20 (75-150  $\mu\text{m}$ , Pharmacia Fine Chemical Co.), Chromatorex ODS (100-200 mesh, Fuji Silysia Chemical Ltd., Japan), Silica gel 60 (Merck) を用いて行った.

TLC は Silica gel 60 F<sub>254</sub> プレート (0.2 mm, Merck) [展開溶媒: toluene-ethyl formate-formic acid (1:7:1),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (9:1:0.1 or 7:3:0.5), *n*-hexane-acetone (4:1 or 2:1), *n*-hexane-AcOEt (2:1 or 1:1)], 及び Cellulose F<sub>256</sub> プレート (0.1 mm, Merck) [展開溶媒: 2% AcOH] を用いた. 検出は UV ランプ及び 1%  $\text{FeCl}_3$ -EtOH 試薬または 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  試薬で行った.

HPLC による分析は, 特に記載しない限り Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II カラム (250  $\times$  4.6 mm,

Nacalai Tesque Inc., Japan) を用い, カラム温度は 35 °C, 溶媒は  $\text{CH}_3\text{CN}$ -50 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  で, 39 分間で 4-30%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , さらに 15 分間で 30-75%  $\text{CH}_3\text{CN}$  のグラジエントで溶出した. 溶出速度は 0.8 ml/min, ポンプは JASCO Intelligent HPLC Pump PU-2080, 検出は JASCO photodiode array detector MD-910 を用いて行った.

### 第 2 章に関する実験

長崎県内の森林から採集した 26 科 35 属 46 種の葉・樹皮・材について, 細断又は粉碎後, 試料重量の 5~15 倍量の 70% EtOH を加え, 室温下で 1 週間抽出した. 各抽出液の総ポリフェノール含量については, フォーリンチオカルト法により MAXline Microplate Readers (Emax™; Molecular Devices Corporation) を用いて測定した. 各抽出液は,  $\text{H}_2\text{O}$  を用いて 11 倍に希釈し, 11 倍希釈で濃すぎたサンプルについては 121 倍に希釈して再度測定した. 希釈した試料溶液 10  $\mu\text{l}$  に精製水 70  $\mu\text{l}$ , フェノール試薬 (関東化学) 30  $\mu\text{l}$  を加え, 3 分間静置後, 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 100  $\mu\text{l}$  を加え, 静かに攪拌した. 1 時間静置後, 690 nm での吸光度を測定した. ブランクは, 試料溶液の代わりに 70% EtOH を用いた. 検量線は, 標品に gallic acid (32, 160, 800, 4000  $\mu\text{M}$ ) を用いて作成した. 測定値については, 試料 1 g を 1 ml の 70% EtOH で抽出した時の含有量 mg に換算したものを使用した.

### 第 3 章に関する実験

#### 第 2 節に関する実験

長崎県対馬市で採集した *P. strobilacea* の木部 (2.0 kg) を粉碎し, チップ (長さ 0.5-1.0 cm, 厚さ 0.2-0.5 cm) としたものを MeOH (3 L) で 3 回, 次いでその残渣を 60% 含水 acetone (3 L) で 3 回抽出した. 得られたエキスは濃縮後合わせて水溶液とし, ヘキサン (1 L) で 2 回溶媒分配し, さらに残った水可溶部について酢酸エチル (1.3 L) で 4 回溶媒分配し, ヘキサン可溶部 (10.3 g) および酢酸エチル可溶部 (50.6 g) を得た.

ヘキサン可溶部は, シリカゲル (0-100% EtOAc in *n*-hexane, 10% stepwise) で 6 つに分画した

(Fr. H1: 5.2 g; Fr. H2: 826 mg; Fr. H3: 2.1 g; Fr. H4: 278 mg; Fr. H5: 900 mg; Fr. H6: 195 mg; Fr. H7: 98 mg). Fr. H1 は、主にワックスおよびトリグリセライドであり、さらにシリカゲル (10-100% CHCl<sub>3</sub> in *n*-hexane, 10% stepwise, 次いで 2-10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>) により 7 つに分画した。Fr. H1-5 および H1-6 はそれぞれシリカゲル (*n*-hexane-CHCl<sub>3</sub>-acetone, 90:9:1-80:18:2) で分画し、Fr. H1-5 から **1** (43 mg), Fr. H1-6 から **4** (163 mg) を単離した。Fr. 3 (2.1 g) は、さらにシリカゲルカラムクロマト (*n*-hexane- EtOAc, 9:1-8:2) に付し、**3** (193 mg) を単離した。Fr. H5 は、析出した結晶をろ過し、**2** (426 mg) を得た。

### 第 3 節に関する実験

加熱前後の成分変化について検討するため、次のように分離操作を行った。熱処理前の酢酸エチル可溶部は、前節 2.2 のものを使用し、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (0-40% aq EtOH; 60% aq acetone) で 9 つに分画した (Fr. A1: 3.6 g; Fr. A2: 6.9 g; Fr. A3: 5.4 g; Fr. A4: 3.3 g; Fr. A5: 2.8 g; Fr. A6: 3.7 g; Fr. A7: 3.4 g; Fr. A8: 8.8 g; Fr. A9: 1.5 g). Fr. A2 は、Sephadex LH-20 (60% aq MeOH) および MCI-gel CHP20P (0-70% MeOH, 10% stepwise) カラムクロマトグラフィーで分画し、**5** (1.3 g) と **6** (78 mg) を得た。Fr. A4 では、**7** が室温下 (90% EtOH) で無色の針状結晶 (691 mg) として生成した。Fr. A8 は、Diaion HP20SS および Chromatorex ODS (0-60% aq MeOH, 10% stepwise) カラムクロマトグラフィーに付し、**8** (286 mg), **9** (374 mg), **10** (222 mg), **12** (22 mg) および **13** (225 mg) を単離した。Fr. A9 は、**8** (1.5 g) であった。

熱処理の方法はノグルミの材の表面をバーナーで焼き、それを粉砕してチップとした。そのチップ 2 kg を MeOH, 次いで 60% 含水アセトンで抽出した。それらを合わせて濃縮した水溶液をヘキサンで溶媒分配し、さらに水可溶部について酢酸エチルで溶媒分配した。得られた酢酸エチル可溶部が最も芳香が強かったため、酢酸エチル可溶部を、Sephadex LH-20 (100% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80% EtOH, 50% aq acetone) に付し、Fr. CA1 (5.00 g), Fr. CA2 (16.6 g), Fr. CA3 (6.5 g), Fr. CA4 (15.7 g) に分画した。Fr. CA1 は、Sephadex LH20 (80% aq MeOH, 50%

acetone), Diaion HP20SS (20-50% aq MeOH, 10% stepwise), silica gel (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O, 90:10:1-70:30:5), silica gel (*n*-hexane-acetone, 1:0-1:1) のカラムクロマトグラフィーにより、**5** (329 mg), **14** (47.3 mg), **15** (71.2 mg), **20** (27.7 mg) を単離した。Fr. CA1 を HPLC 分析した結果、標品と比較して **16** および **17** の存在を確認した。Fr. CA2 は、Sephadex LH20 (100% EtOH), MCIgel CHP20P (0-100% MeOH, 10% stepwise), Sephadex LH-20 (40-100% aq MeOH, 10% stepwise) の条件によるカラムクロマトグラフィーに付し、**6** (2.4 g) および **22** (52.6 mg) を単離した。Fr. CA3 は 90% EtOH 中で結晶が析出したのでろ過し、結晶は **7** (0.8 g) であった。ろ液については MCIgel CHP20P (0-100% MeOH, 10% stepwise) カラムクロマトグラフィーにより、4 つに分画した (Fr. CA3-1: 295 mg; Fr. CA3-2: 493 mg; Fr. CA3-3: 355 mg; Fr. CA3-4: 70.2 mg). Fr. CA3-1 は **6** (108 mg) および **21** (295 mg) であり、Fr. CA3-3 は **18** (355 mg) であった。Fr. CA3-2 は、Chromatorex ODS (0-100% MeOH, 5% stepwise) カラムクロマトにより、**19** (122 mg) を単離した。Fr. CA4 は、Diaion HP20SS (0-100% aq MeOH, 10% stepwise), Sephadex LH-20 [(60-100% aq MeOH, 10% stepwise), 50% aq acetone] のカラムクロマトにより、**8** (2.19 g) および **23** (116 mg) を単離した。

#### 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin (1)

Colorless needles (hexane). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.83 (1H, s, H-5), 6.66 (1H, s, H-8), 5.66 (1H, br s, H-2), 2.29 (3H, m, H-3, 4), 2.21 (3H, s, H-15), 1.95 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-11), 1.82 (1H, dd, *J*=6.9, 20.0 Hz, H-12), 0.85 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-13), 0.65 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-14); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 152.0 (C-2), 134.6 (C-8), 131.4 (C-9), 131.2 (C-10), 131.0 (C-4), 123.8 (C-3), 120.8 (C-7), 109.8 (C-1), 43.5 (C-5), 32.6 ~ 30.4 (C-6, -12), 25.8 (C-15), 20.3 (C-13), 19.0 (C-14), 15.5 (C-11).

#### 8,11-Dihydroxy-2,4-cycloodesmane (2)

Colorless needles (hexane). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup>+0.1 (*c*=0.3, EtOH). HR EI-MS *m/z*: 238.1914.

(C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> requires 238.1934). IR  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3302,

3042, 2947, 1454, 1378;  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra, see Table 2.

#### 11-Hydroxy-2,4-cycloeudesmane-8-one (3)

Colorless syrup.  $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$  -34.2 ( $c=0.3$ , EtOH). HR EI-MS  $m/z$ : 236.1754. ( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$  requires 238.1772). IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3509, 2951, 1688, 1455;  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra, see Table 3.

#### 2,4-Cyclo-7(11)-eudesmen-8-one (4)

Colorless syrup.  $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$  -86.5 ( $c=0.3$ , EtOH). HR EI-MS  $m/z$ : 218.1665 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$  requires 218.1672). IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2941, 1673, 1590, 1454. UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 251 (3.73);  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra, see Table 4.

#### 8,11-Dihydroxy-2,4-cycloeudesmane (2) の絶対構造

化合物 **2** (20.2 mg) を  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0.3 ml) および  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (50 mg) 溶液に加え、 $80^\circ\text{C}$  で 40 分間攪拌した。室温条件下で isopropyl alcohol (1.5 ml) を加え、3 時間静置した。溶液を減圧濃縮後、*n*-hexane で溶媒分配を 3 回行い、得られたヘキサン可溶部について TLC 分析を行った結果、化合物 **3** と **4** と同じ Rf 値の化合物を確認した。ヘキサン可溶部を濃縮後、MeOH (3.0 ml) に溶解し、TFA (0.3 ml) を加え、12 時間室温下に静置した。反応液を濃縮し、silica gel (*n*-hexane-EtOAc, 9:1) に付し、化合物 (10.3 mg) を得た。得られた化合物は  $[\alpha]_{\text{D}}^{19}$  -74.7 ( $c=0.4$ , EtOH) であり、 $^1\text{H}$ -NMR の値も化合物 **4** と一致した。化合物 **2** を酸化し、脱水反応した生成物は化合物 **4** であったので、化合物 **2** の絶対配置も化合物 **4** と同じであると結論づけた。

#### 11-Hydroxy-2,4-cycloeudesmane-8-one (3) の絶対構造

化合物 **3** (10.2 mg) を MeOH 1 ml に溶かし、TFA 100  $\mu\text{l}$  を加え、12 時間室温放置した。反応液を silica gel (*n*-hexane-EtOAc, 9:1) に付し、分離操作を行った。TLC 分析の結果、**4** と同様の Rf 値および UV 吸収を示したフラクションを減圧濃縮し、化合物 (6.4 mg) を得た。この化合物の比旋光度は、 $[\alpha]_{\text{D}}^{19}$  -86.6 ( $c=0.2$ , EtOH) であり、 $^1\text{H}$ -NMR の値も **4** と一致した。化合物 **3** を脱水反応した生

成物は化合物 **4** であったので、化合物 **3** の絶対配置も化合物 **4** と同様であると結論づけた。

#### ノグルミ材を熱処理した香気中のテルペノイドの確認

自然乾燥したノグルミ材のチップをステンレス製ドライオーブンで  $200^\circ\text{C}$  で 30 分間加熱した。そのときに発生する香気をアスピレータで吸引し、オーブンとアスピレータの間には  $\text{CHCl}_3$  の入った吸引瓶を配置してテルペノイドをトラップした。

#### Oak lactone precursor (5)

White amorphous powder.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 4.33 (1H, d,  $J=8$  Hz, H-1'), 3.86 (1H, dd,  $J=3, 12$  Hz, H-6'), 3.69 (1H, dd,  $J=5, 12$  Hz, H-6'), 3.63 (1H, m, H-4), 3.36 (1H, t,  $J=9$  Hz, H-3'), 3.34 (1H, t,  $J=9$  Hz, H-4'), 3.22 (1H, ddd,  $J=3, 5, 9$  Hz, H-5'), 3.17 (1H, dd,  $J=8, 9$  Hz, H-2'), 2.59 (1H, dd,  $J=8, 15$  Hz, H-2), 2.26 (1H, m, H-3), 2.12 (1H, dd,  $J=8, 15$  Hz, H-5'), 1.27-1.63 (6H, m, H-5, -6, -7), 0.95 (3H, d,  $J=7$  Hz, H-9), 0.92 (3H, t,  $J=7$  Hz, H-8).

#### Gallic acid (6)

White amorphous powder.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.00 (s)

#### Ellagic acid (7)

White amorphous powder.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.28 (s)

#### 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose (8)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.06 (15H, s, H-galloyl), 6.32 (1H, d,  $J=8$  Hz, H-1), 6.01 (1H, t,  $J=9$  Hz, H-3), 5.63 (2H, m, H-2, -4), 4.55 (2H, m, H-5), 4.37 (1H, dd,  $J=4$  Hz, H-6)

#### 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose (8) の熱分解

化合物 **8** (400 mg) をガラス製バイアル瓶 (20 ml) に入れ、 $200^\circ\text{C}$  で 30 分間加熱した。処理後の反応物は、MCI-gel CHP20P (0-100% aq MeOH) に付し、**6** (53.8 mg), **21** (10.5 mg), **8** (66.0 mg)

および重合した混合物 (46.8 mg)を得た。化合物 **6** を同様の条件で処理し、HPLC 分析した結果、少量の **21** が生成していた。

Eugeniin (9)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.13 ~ 6.95 (H-galloyl), 6.63, 6.48 (H-HHDP), 5.85 (t,  $J=9$  Hz, H-3), 5.59 (t,  $J=8$  Hz, H-2), 5.42 (t,  $J=10$  Hz, H-4), 5.38 (dd,  $J=6, 14$  Hz, H-6), 4.53 (dd,  $J=6, 10$  Hz, H-5), 6.21 (d,  $J=8$  Hz, H-1), 3.38 (d,  $J=14$  Hz, H-6).

Pedunculagin (10)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.68, 6.60, 6.53, 6.50, 6.34 (4H, s, H-HHDP), 5.71-3.64 (7H, m, H-1, -2, -3, -4, -5, -6).

1( $\beta$ )-O-Galloyl pedunculagin (11)

White amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.17 (2H, s, H-galloyl), 6.67, 6.53, 6.45, 6.35 (s, H-HHDP), 6.21 (d,  $J=8.3$  Hz, H-1), 5.44 (t,  $J=9.3, 10.3$  Hz, H-3), 5.35 (dd,  $J=6.3, 6.8$  Hz, H-6), 5.17 (dd,  $J=8.8, 8.9$  Hz, H-2), 5.16 (dd,  $J=10.3$  Hz, H-4), 4.49 (dd,  $J=6.3, 9.8$  Hz, H-5), 3.87 (d,  $J=12.7$  Hz, H-6).

Casuariin (12)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.80, 6.60, 6.45, (1H, d,  $J=5$  Hz, H-HHDP), 5.65 (1H, D,  $J=2$  Hz, H-1), 5.40 (1H, t,  $J=3$  Hz, H-3), 5.03 (1H, dd,  $J=3, 9$  Hz, H-4), 4.73 (1H, dd,  $J=3, 5$  Hz, H-2), 4.62 (1H, dd,  $J=3, 13$  Hz, H-6), 4.13 (1H, dd,  $J=3, 9$  Hz, H-5), 3.81 (1H, d,  $J=13$  Hz, H-6).

Casuarinin (13)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.10 (2H, s, H-HHDP), 6.91, 6.62, 6.53 (3H, s, H-HHDP), 5.60 (1H, d,  $J=5$  Hz, H-1), 5.36 (3H, br, H-3, -4, -2), 4.65 (1H, dd,  $J=2, 5$  Hz, H-6), 4.16 (1H, dd,  $J=3, 13$  Hz, H-5), 4.03 (1H, d,  $J=13$  Hz, H-6).

Coniferylaldehyde (14)

Brown syrup.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 9.56 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1), 7.57 (1H, d,  $J=16$  Hz, H-3), 7.24 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 7.15 (1H, dd,  $J=8.0, 2.0$  Hz, H-6'), 6.84 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 6.64 (1H, dd,  $J=16, 7.8$  Hz, H-2), 3.89 (3H, s, H-3').

Sinapylaldehyde (15)

Brown syrup.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 9.56 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1), 7.56 (1H, d,  $J=16$  Hz, H-3), 6.97 (2H, s, H-2', 6'), 6.66 (1H, dd,  $J=16, 7.8$  Hz, H-2), 3.88 (6H, s, H-3', 5').

Vanillin (16)

HPLC 分析により、標品 ( $t_R=28.1$  min)と比較し、同定した。

Syringaldehyde (17)

HPLC 分析により、標品 ( $t_R=30.3$  min)と比較し、同定した。

Quercetin 3-O-rhamnoside (18)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.32 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 7.30 (1H, dd,  $J=8.3, 2.4$  Hz, H-6'), 6.90 (1H, d,  $J=8.3$  Hz, H-5'), 6.35 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-8), 6.18 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 5.34 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-1' ' '), 4.21 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2' ' '), 3.74 (1H, dd,  $J=9.3, 3.4$  Hz, H-3' ' '), 3.38-3.45 (1H, m, H-5' ' '), 3.31-3.29 (1H, m, H-4' ' '), 0.93 (3H, d,  $J=5.9$  Hz, H-6' ' ').

Myricetin 3-O-rhamnoside (19)

Yellow amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 12.72 (1H, s, OH-5'), 7.09 (2H, s, H-2', -4'), 6.45 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 6.24 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-8), 5.47 (1H, brs, H-1' ' '), 4.21 (1H, s, H-2' ' '), 3.76 (1H, dd,  $J=9.3, 2.9$  Hz, H-3' ' '), 3.48-3.55 (1H, m, H-5' ' '), 3.36 (1H, t,  $J=9.3$  Hz, H-4' ' '), 0.93 (3H, d,  $J=5.9$  Hz, H-6' ' ').

(-)-Episyringaresinol (20)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.64 (4H, s, H-arom protons), 4.84 (1H, d,  $J=5.0$  Hz, H-2), 4.24 (1H, d,  $J=7.0$  Hz, H-6), 3.84 (12H, s, H- $\text{OCH}_3$ ), 3.30 (2H, m, H-5), 2.90 (1H, m, H-1).

#### *m*- and *p*-Digallic acid (21)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.40, 7.25 (2H, d,  $J=2.0$  Hz, *m*-H-4', -6'), 7.23 (2H, s, *p*-H-2, -6), 7.21 (2H, s, *m*-H-2, -6), 7.11 (2H, s, *p*-H-3', -5').

#### 6'-*O*-Digalloyl oak lactone precursor (22)

Brown amorphous powder.  $[\alpha]_D^{24}$  -19.05 ( $c=0.1$ , MeOH). HR ESI-TOF MS  $m/z$ : 663.1907  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{16}\text{Na}$  requires 663.1901). IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3391, 1699, 1327, 1211, 1036. UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 276 (4.35);  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra, see Table 6.

#### 6'-*O*-Digalloyl oak lactone precursor (22) の加水分解

化合物 **22** (10 mg) を溶かした水溶液に tannase を加え、室温で 10 時間静置した。得られた反応物は、Sephadex LH-20 (0-40% aq MeOH) および silica gel ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 40:10:1 および 14:6:1) で分離・精製し、**5** (2.4 mg) を得た。

#### 3-*O*-Methylelagic acid

#### 4'-*O*-(4' '-*O*-galloyl)-xylopyranoside (23)

Brown amorphous powder.  $[\alpha]_D^{24}$  +0.87 ( $c=0.1$ , MeOH). HR FAB MS  $m/z$ : 601.0823  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{O}_{16}$  requires 601.0828). IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3409, 1716, 1608, 1348. UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 361 (4.02), 250 (4.69).  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra, see Table 7.

#### 3-*O*-Methylelagic acid

#### 4'-*O*-(4' '-*O*-galloyl)-xylopyranoside (23) の加水分解および糖部分の絶対構造

化合物 **23** (10 mg) を 20% MeOH に溶解し、tannase を加え、室温で 10 時間静置した。反応液を濃縮してろ過し、残った沈殿 (1.5 mg) を得た。この生成物は分光学的データ<sup>38)</sup>から 3-*O*-methyl ellagic acid 4'-*O*-xylopyranoside と同定した。xylose

の絶対構造を決定は次のように行った。化合物 **23** (4 mg) を 0.05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.2 ml) に溶解し、100 ° C で 5 時間処理した。Amberlite IRA400 (OH form) を加え中和した後、ろ過して樹脂を除き、ろ液を乾燥させた。残渣は L-cysteine methyl ester (5 mg) の pyridine (0.5 ml) 溶液に溶解し、60 ° C で 1 時間加熱した。さらに、*o*-torylisothiocyanate (5 mg) の pyridine (0.5 ml) 溶液を加え、60 ° C で 1 時間加熱した。反応液を HPLC 分析 [Cosmosil 5C<sub>18</sub>AR II; 25%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in water containing 50mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; flow rate, 0.8 ml/min; detection, 250 nm] した結果、 $t_R$  値 20.1 min のピークは、D-xylose の thiocarbamoyl thiazolidine 誘導体であった<sup>39)</sup>。

#### 第 4 章に関する実験

長崎県諫早市で採集したゴンズイの新鮮な葉および樹皮それぞれ 500 g を 80% 含水アセトン (1.5 L) で室温下 3 回抽出した。抽出液は減圧下アセトン留去し、析出した沈殿を濾去、濾液をさらに濃縮した。

葉のエキスは、Diaion HP20SS (10-100% MeOH, 10% stepwise) に付し、Fr. 1 (3.2 g), Fr. 2 (12.8 g), Fr. 3 (5.45 g) に分画した。Fr. 3 はアセトンで溶出されるクロロフィルなどの低極性分子であった。TLC 分析 [silica gel 60 F<sub>254</sub> プレート, 展開溶媒: toluene-ethyl formate-formic acid (1:5:2)] の結果、Fr. 1 は発色するスポットが確認されず、Fr. 2 に認められた。そこで Fr. 2 について Sephadex LH-20 [(60-100% aq MeOH, 20% stepwise), MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ -acetone (90:5:5, 80:10:10, 60:20:20, 0:50:50)] により 4 つに分画した。Fr. 22 の  $^1\text{H-NMR}$  を測定した結果、文献値と比較して **11** (6.41 g) であると同定した。Fr. 24 は、さらに Sephadex LH-20 [EtOH- $\text{H}_2\text{O}$ -acetone (100:0:0, 90:10:0, 80:20:0, 60:40:0, 54:36:10, 48:32:20, 36:24:30, 0:1:1) および Chromatorex ODS (5-50% aq MeOH, 5% stepwise) クロマトで分離操作を行い、**24** (0.30 g) を得た。

樹皮のエキスは、Diaion HP20SS (0-100% aq MeOH, 10% stepwise) カラムクロマトに付し、Fr. 1 (16.6 g), Fr. 2 (2.17 g), Fr. 3 (0.10 g), Fr. 4 (86.4 mg), Fr. 5 (0.02 g) に分画した。Fr. 1 は水だけで溶出された部分で、主に糖を含み、Fr. 5 はア

セトンで溶出される低極性分子を含む。Fr. 4 は 60% MeOH 中で結晶の析出が確認され、その結晶について <sup>1</sup>H-および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定した結果、**25** (26.4 mg) と決定した。

#### Euscaphinin (24)

White amorphous powder.  $[\alpha]_D^{30} +40.5$  ( $c=0.2$ , acetone-H<sub>2</sub>O, 1:1, v/v). UV  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 261 (4.35). IR  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>: 3445, 1733, 1615, 1515, 1446. MALDI-TOF-MS  $m/z$ : 1893 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. Calcd for C<sub>82</sub>H<sub>54</sub>O<sub>52</sub> · 5H<sub>2</sub>O: C, 50.22; H, 3.29. Found: C, 50.11; H, 3.21. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra, see Table 8.

#### Euscaphinin (24) のメチル化およびメタノリシス

**24** (50 mg) を MeOH (3 ml) に溶かし、CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> を加え、4 ° C で 15 時間静置した。反応液を減圧濃縮したものに 5% aq NaOH-MeOH (1:2, v/v) を加え、80 ° C で 1 時間処理した。MeOH を除いた後、水溶液に 2 M HCl を加え酸性とし、エーテルで分配した。エーテル可溶部は Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて乾燥後、CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> の入ったエーテルを加えて、4 ° C で 15 時間静置した。減圧濃縮後、残渣を silica gel (toluene-acetone, 98:2 ~ 92:8) に付し、dimethyl pentamethyl dehydrodigallate (**24a**; 7.8 mg) と dimethyl (S)-4,4',5,5',6,6'-hexamethoxydiphenolate (**24b**; 29.9 mg) を得た。**24b** のビフェニル結合のアトロプ異性が S-配置であることは、旋光度が負の値 ( $[\alpha]_D -24.0$ ) を示したことから確認した。

#### Euscaphinin (24) の部分加水分解

**24** (2 mg) を H<sub>2</sub>O (1.0 ml) に溶かし、100 ° C で 2 時間加熱した。反応液を HPLC 分析した結果、13.26 min および 17.11 min にピークを確認し、2,3,4,6-bis-(S)-HHDP-D-glucose の  $\alpha$  と  $\beta$  の混合物である pedunculagin (**10**) が生成した。

#### Euscaphinin (24) の糖部分の絶対構造

**24** (5 mg) に 1 M HCl (0.2 ml) を加えて 100 ° C で 10 時間処理して酸加水分解後、Amberlite IRA400 (OH form) を加え中和した後、ろ過して樹脂を除き、ろ液を乾燥させた。残渣は L-cysteine methyl ester (2mg) の pyridine (0.2 ml) 溶液に

溶解し、60 ° C で 1 時間加熱した。さらに、*o*-troylisothiocyanate (2 mg) の pyridine (0.2 ml) 溶液を加え、60 ° C で 1 時間加熱した。反応液を HPLC 分析した結果、 $t_R = 17.48$  min に検出され、D-glucose であることを確認した。

#### 3,3'-Di-*o*-methylellagic acid (25)

White amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.57 (1H, s, H-5, -5'), 4.13, 4.11, 4.10 (1H, s, H-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 159.15 (C-7, -7'), 153.29 (C-4, -4'), 141.76 (C-2, -2'), 141.04 (C-3, -3'), 112.94 (C-6, -6'), 112.42 (C-1, -1'), 112.16 (C-5, -5'), 61.20 (C-OCH<sub>3</sub>).

#### 第 5 章に関する実験

ヤマハゼの心材 (黄色) のみを切り出し、自然乾燥させたチップ 500 g を 80% 含水アセトン (1.5 L) で 3 回抽出した。得られたエキスは濃縮後、水溶液とし、Sephadex LH-20 [(20-100% aq MeOH, 20% stepwise), 100% acetone] クロマトに付し、5 つに分画した (Chart 4-1)。さらに、silica gel [CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O, (100:0:0, 90:10:1, 85:15:1, 80:20:2)], DIAION HP20SS (0-100% aq MeOH, 10% stepwise), Chromatorex ODS (10-50% aq MeOH, 5% stepwise) により、繰り返し分離・精製して、**6** (0.22 g), **26** (7.79 g), **27** (10.0 mg), **28** (0.99 g), **29** (12.0 mg), **30** (2.65 g), **31** (0.09 g) および **32** (0.05 g) を得た。

#### Fustin (26)

Colorless needles (H<sub>2</sub>O-MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.71 (d,  $J=8.9$  Hz, H-5), 7.08 (d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.92 (dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz, H-6'), 6.84 (d,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 6.61 (dd,  $J=2.4, 8.5$  Hz, H-6), 6.39 (d,  $J=2.4$  Hz, H-8), 4.98 (d,  $J=12.2$  Hz, H-2), 4.53 (d,  $J=11.7$  Hz, H-3); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 193.2 (C-4), 165.8 (C-7), 164.5 (C-8a), 146.5 (C-4'), 145.7 (C-3'), 130.0 (C-1'), 129.7 (C-5), 120.8 (C-6'), 115.9 (C-5'), 115.7 (C-2'), 113.0 (C-4a), 111.7 (C-6), 103.6 (C-8), 84.9 (C-2), 73.9 (C-3).



Eriodictyol (27)

Yellow amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.92 (m, H-2', -3', -6'), 5.92 (m, H-6, -8), 5.34 (dd,  $J=3.4, 12.9$  Hz, H-2), 3.11 (dd,  $J=12.7, 17.1$  Hz), 2.68 (dd,  $J=3.0, 17.1$  Hz, H-3).

2, 3', 4', 6-Tetrahydroxy-2-benzyl coumaranone (28)

Red syrup.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.28 (d,  $J=8.3$  Hz, H-4), 6.69 (d,  $J=2.0$  Hz, H-6'), 6.58 (d,  $J=8.3$  Hz, H-3'), 6.51 (dd,  $J=2.0, 7.8$  Hz, H-2'), 6.48 (dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz, H-5), 6.32 (d,  $J=2.0$  Hz, H-7), 3.07 (d,  $J=14.1$  Hz, H- $\alpha$ -CH $_2$ ), 3.02 (d,  $J=13.7$  Hz, H- $\alpha$ -CH $_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 173.6 (C-3), 167.9 (C-6), 145.2 (C-4'), 144.7 (C-4, -7a), 126.5 (C-2', -6'), 122.8 (C-1'), 118.4 (C-3'), 113.3 (C-5'), 111.8 (C-3a), 106.8 (C-2), 98.8 (C-5, -7), 41.9 (C- $\alpha$ -CH $_2$ ).

Sulphuretin (29)

Yellow amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.60 (d,  $J=8.3$  Hz, H-4), 7.52 (d,  $J=2.0$  Hz, H-6'), 7.30 (dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz, H-2'), 6.91 (d,  $J=8.3$  Hz, H-3'), 6.79 (d,  $J=1.5$  Hz, H-7), 6.74 (dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz, H-5), 6.63 (s, H-C=CH).

Polygalloyl- $\beta$ -D-glucose (30)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.06 (15H, s, H-galloyl), 6.32 (1H, d,  $J=8.3$  Hz, H-1), 6.01 (1H, t,  $J=9.5$  Hz, H-3), 5.63 (2H, m, H-2, -4), 4.55 (2H, m, H-5), 4.37 (1H, dd,  $J=4.4$  Hz, H-6).

3-O-Galloyl fustin (31)

Yellow amorphous powder.  $[\alpha]_D^{29}$  -15.0 ( $c=0.5$ , 50% aq acetone). FAB-MS  $m/z$ : 463  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . HR-FAB-MS  $m/z$ : 441.0845 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$  requires 441.0821). m. p. 174-178 ° C. IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3396, 1684, 1615, 1521, 1464, 1344, 1221. UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 279 (4.38).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.12 (d,  $J=2.0$  Hz, H-6'), 7.04

(s, H-galloyl), 6.95 (dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz, H-5'), 6.81 (d,  $J=7.8$  Hz, H-2'), 6.64 (d,  $J=2.0, 2.4, 8.5$  Hz, H-6), 6.45 (d,  $J=2.4$  Hz, H-8), 5.90 (d,  $J=12.1$  Hz, H-3), 5.51 (d,  $J=12.2$  Hz, H-2), 5.23 (d,  $J=8.3$  Hz, H-5);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 187.6 (C-4), 165.8 (C-7), 165.8 (C-6), 164.0 (C-8a), 146.8 (C-4'), 145.9 (C-galloyl), 145.9 (C-3'), 139.1 (C-galloyl), 129.9 (C-1'), 128.8 (C-5), 120.8 (C-6'), 120.6 (C-galloyl), 115.8 (C-5'), 115.4 (C-2'), 113.7 (C-4a), 112.0 (C-6), 110.1 (C-galloyl), 103.7 (C-8), 82.6 (C-2), 74.5 (C-3).

3' (4')-O-Galloyl fustin (32)

Yellow amorphous powder.  $[\alpha]_D^{29}$  +0.86 ( $c=0.1$ , 50% aq acetone). FAB-MS  $m/z$ : 463  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . HR-FAB-MS  $m/z$ : 441.0817 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$  requires 441.0821). m. p. 132-134 ° C. IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3368, 2718, 1700, 1684, 1619, 1521, 1467, 1353, 1262, 1217. UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 278 (4.46).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.73 (d,  $J=8.3$  Hz, H-5), 7.72 (d,  $J=8.8$  Hz, H-5), 7.38 (d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 7.35 (dd,  $J=2.4, 8.3$  Hz, H-6'), 7.27 (H-galloyl), 7.26 (d,  $J=1.5$  Hz, H-2'), 7.17 (d,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 7.13 (dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz, H-6'), 7.05 (d,  $J=8.3$  Hz, H-5'), 6.63 (dd,  $J=2.0, 5.4, 6.6$  Hz, H-6), 6.61 (dd,  $J=2.0, 2.4, 6.6$  Hz, H-6), 6.44 (d,  $J=2.4$  Hz, H-8), 6.41 (d,  $J=2.0$  Hz, H-8), 5.12 (d,  $J=5.9$  Hz, H-2), 5.09 (d,  $J=5.9$  Hz, H-2), 4.60 (d,  $J=12.2$  Hz, H-3), 4.56 (d,  $J=11.7$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 193.0 (C-4), 192.8 (C-4), 165.9 (C-COO), 165.0 (C-7), 164.3 (C-8a), 150.6 (C-3'), 149.8 (C-3'), 146.1 (C-C3, -C5), 140.3 (C-4'), 139.7 (C-4'), 139.3 (C-4), 130.0 (C-5), 129.7 (C-1'), 124.0 (C-1), 123.9 (C-1), 120.8 (C-6'), 120.1 (C-5'), 117.5 (C-2'), 117.4 (C-2'), 113.0 (C-4a), 111.9 (C-6), 111.8 (C-6), 110.5 (C-2, -6), 103.6 (C-8), 84.4 (C-2), 84.3 (C-2), 74.0 (C-3), 73.8 (C-3).

3-O-Galloyl fustin (31) および

### 3' (4')-*O*-Galloyl fustin (32)の加水分解

化合物 **31** および **32** (1 mg)それぞれを H<sub>2</sub>O (1 ml)に溶かし, tannase を加え, 室温で 10 時間静置した. 得られた反応物を HPLC 分析した結果, 標品と比較して gallic acid (**6**)および fustin (**26**)に分解されていることを確認した.

### ORAC 法による抗酸化活性の測定

ORACの測定はPriorらの方法<sup>68)</sup>を改変して次のように行った. 改変した点は試料のプレート内での配置を点対称に2反復とした点である. まず, 試料を AWA 溶液 (acetone-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>COOH, 70:29.5:0.5) で 1 mg/ml の濃度に溶解した後, 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で 4 段階 (×100, ×200, ×400, ×800)に希釈し, 測定に供した. Trolox 溶液 (6.25, 12.5, 25, 50 μM/75 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4) を 96 穴マイクロプレートに 20 μl 入れ, さらにフルオレセイン溶液 (94.4 nM/75 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4) を 200 μl 加え, 37 ° C に保った蛍光プレートリーダーを用い, フルオレセインの蛍光強度を測定した. その後, AAPH 溶液 (31.7 mM/75 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4) を 75 μl 加えて振とう攪拌後, 添加後 0 分から 2 分間隔で 90 分間蛍光強度の経時変化を測定した. 蛍光強度は, PerkinElmer 2030 Multilabel Reader ARVO X2 により測定した. データ解析は WorkOut 2.5 (Dazdaq Solutions Ltd.) を使用し, 蛍光強度を経時的に記録したグラフの曲線下面積 (AUC) を算出し, ブランクの AUC を差し引いた値 (net AUC) を求めた. Trolox 標準溶液の濃度を横軸に, その net AUC を縦軸にとり二次近似した検量線を用い, 希釈した試料の ORAC 値を Trolox 相当量 (TE) として算出した. 試料の希釈は上記のように行ったが, 検量線範囲内に入らない場合は適宜希釈率を変更して操作を繰り返した.

### 第 6 章に関する実験

長崎県諫早市にて採集したイヌマキの果托および種子を使用した.

### 第 2 節に関する実験

果托 500 g を 2% トリフルオロ酢酸酸性 50% 含水アセトンニトリルで抽出後, MCI-gel CHP20P,

Cosmosil 40C<sub>18</sub> PREP で分離・精製することにより, **33** (4.5 mg), **34** (206.9 mg) および **35** (7.6 mg) が得られた (Chart 5-1). その他の成分については, イヌマキ果托 2.5 kg をそれぞれ MeOH および 50% 含水アセトンで抽出後, エーテル及び酢酸エチルで分配し, 酢酸エチル可溶部, 水可溶部について, 各種カラムクロマトグラフィーで分離・精製した結果 (Chart 5-2), **36** (2.6 mg), **37** (3.2 mg), **38** (27.3 mg), **39** (4.4 mg), **40** (8.9 mg), **41** (8.4 mg), **42** (7.0 mg), **43** (5.7 mg), **44** (26.0 mg), **45** (21.0 mg), **46** (10.2 mg), **47** (23.4 mg), **48** (23.6 mg), **49** (5.3 mg), **50** (13.9 mg) および proanthocyanidin oligomer (Fr. IRW33: 2.60 g) が得られた.

### Pelargonidin 3-*O*-β-D-glucoside (33)

Red amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA-*d* (19:1)) δ: 9.05 (s, H-4), 8.57 (d, *J*=7.8 Hz, H-2', -6'), 7.03 (d, *J*=8.9 Hz, H-3', -5'), 6.89 (s, H-8), 6.65 (s, H-6), 5.25 (s, H-1''), 3.94, 3.86 (s, H-6' a, -6' b), 3.74-3.42 (H-2'', -3'', -4'', -5''): <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA-*d* (9:1)) δ: 171.2 (C-7), 166.6 (C-4'), 164.7 (C-2), 158.2 (C-5), 158.2 (C-9), 145.8 (C-3), 137.8 (C-4), 136.1 (C-2', -6'), 121.7 (C-1'), 117.9 (C-3', -5'), 114.2 (C-10), 103.9 (C-1''), 103.5 (C-6), 95.2 (C-8), 78.8 (C-5''), 78.1 (C-3''), 74.8 (C-2''), 71.1 (C-4''), 62.4 (C-6'').

### Cyanidin 3-*O*-β-D-glucoside (34)

Red amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA-*d* (19:1)) δ: 8.97 (s, H-4), 8.20 (dd, *J*=2.4, 8.9 Hz, H-6'), 7.99 (d, *J*=2.4 Hz, H-2'), 6.97 (d, *J*=8.9 Hz, H-5'), 6.84 (d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.62 (d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.27 (s, H-1''), 3.94-3.20 (H-2'', -3'', -4'', -5'', -6''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA-*d* (19:1)) δ: 170.5 (C-7), 164.1 (C-2), 159.3 (C-5), 157.7 (C-9), 155.8 (C-4'), 147.4 (C-3'), 145.6 (C-3), 136.8 (C-4), 128.2 (C-6'), 121.2 (C-1'), 118.4 (C-2'), 117.5 (C-5'), 113.3 (C-10), 103.7 (C-6), 103.3 (C-1''), 95.1

(C-8), 78.8 (C-5''), 78.1 (C-3''), 74.8 (C-2''), 71.1 (C-4''), 62.4 (C-6'').

#### Delphinidin 3-O-β-D-glucoside (35)

Red amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA-*d* (19:1)) δ : 8.92 (s, H-4), 7.73 (s, H-2', -6'), 6.82 (s, H-8), 6.62 (s, H-6), 5.30 (s, H-1''), 3.92, 3.90 (m, H-6' a, -6' b), 3.74-3.43 (H-2'', -3'', -4'', -5''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA-*d* (19:1)) δ : 170.3 (C-7), 164.1 (C-2), 159.6 (C-5), 159.1 (C-9), 147.5 (C-3', -5'), 145.8 (C-3), 144.8 (C-4'), 136.2 (C-4), 120.0 (C-1'), 113.3 (C-10), 112.6 (C-2', -6'), 103.6 (C-6, C-1''), 97.2 (C-8), 78.8 (C-5''), 78.0 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.0 (C-4''), 62.3 (C-6'').

#### Vitexin (36)

Yellow amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 7.98 (d, *J*=8.5 Hz, H-2', -6'), 6.88 (d, *J*=8.8 Hz, H-3', -5'), 6.72 (s, H-3), 6.18 (s, H-6), 4.69 (d, *J*=10.2 Hz, H-1''), 3.8-3.2 (H-2'', -3'', -4'', -5', -6'').

#### Diosmetin 8-C-glucoside (37)

Yellow amorphous powder. MALDI-TOF-MS *m/z*: 463 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.62 (d, *J*=8.8 Hz, H-6'), 7.54 (s, H-2'), 6.57 (s, H-3), 6.30 (s, H-6), 4.97 (d, *J*=9.8 Hz, H-1''), 4.60-3.69 (H-2'', -3'', -4'', -5', -6''), 3.93 (s, H-OCH<sub>3</sub>).

#### 2''-O-Rhamnosyl vitexin (38)

Yellow amorphous powder. MALDI-TOF-MS *m/z*: 601 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.84 (d, *J*=8.8 Hz, H-2', -6'), 6.94 (H-3', -5'), 6.6 (H-3), 6.27 (H-6), 5.18 (H-1''), 5.02 (H-1''), 4.27-3.69 (H-2'', -3'', -4'', -5', -6', H-2''', -3'''), 3.11 (t, *J*=9.5 Hz, H-4'''), 2.44 (dd, *J*=6.3, 9.3 Hz, H-5'''), 0.64 (d, *J*=6.3 Hz, H-6'''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 184.18, 183.99 (C-4), 166.99, 166.91 (C-3', -5'), 166.74,

166.53 (C-2), 164.44, 164.04 (C-7), 162.81, 162.56 (C-5, -4'), 157.98, 157.77 (C-9), 130.15, 129.99 (C-2', -6'), 123.58, 123.42 (C-1'), 105.95, 105.89 (C-10), 105.74, 105.52 (C-8), 103.62, 103.53 (C-3), 102.56, 102.37 (C-1'''), 99.87, 99.81 (C-6), 82.89, 82.68 (C-5''), 81.63, 81.48 (C-3''), 78.13, 78.04 (C-2''), 73.72, 73.59 (C-1''), 73.53, 73.43 (C-4'''), 72.43, 72.37 (C-2'''), 72.23, 72.12 (C-4''), 71.93, 71.84 (C-3'''), 69.97, 69.84, (C-5'''), 63.02, 63.01 (C-6''), 18.05, 17.97 (C-6''').

#### 2''-O-Rhamnosyl scoparin (39)

Yellow amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ : 7.55 (d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.73 (dd, *J*=2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.92 (s, H-3), 6.89 (d, *J*=9.0 Hz, H-5'), 6.25 (s, H-6), 4.96 (s, H-1'''), 4.75 (d, *J*=8.0 Hz, H-1''), 3.87 (s, H-OCH<sub>3</sub>), 4.63-3.60 (H-2'', -3'', -4'', -5'', -6'', H-2''', -3''', -4''', -5'''), 0.46 (d, *J*=8.0 Hz, H-6'''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ : 182.2 (C-4), 164.1 (C-2), 162.4 (C-7), 160.7 (C-5), 156 (C-9), 151 (C-3'), 148.2 (C-4'), 122 (C-1'), 121.3 (C-6'), 115.6 (C-5'), 110.7 (C-2'), 104.5 (C-10), 104.3 (C-8), 103.1 (C-3), 100.5 (C-1'''), 98.3 (C-6), 81.9 (C-5''), 79.9 (C-3''), 75.3 (C-2''), 71.6 (C-1''), 70.8 (C-4'''), 70.6 (C-4''), 70.6 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 68.3 (C-5'''), 61.5 (C-6''), 56.4 (C-OCH<sub>3</sub>), 17.8 (C-6''').

#### 2''-O-Glucosyl vitexin (40)

Yellow amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 6.59 (s, H-3), 6.24 (s, H-6), 7.97, 7.84 (d, *J*=8.8 Hz, H-2', -6'), 6.93 (d, *J*=8.8 Hz, H-3', -5'), 5.10 (d, *J*=10.2 Hz, H-1''), 5.18 (d, *J*=9.5 Hz, H-1''), 4.37-2.76 (H-2'', -3'', -4'', -5'', -6'', -1''', -2''', -3''', -4''', -5''', -6'''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 184.1, 184.2 (C-4), 166.5, 166.3 (C-2), 164.6, 164.9 (C-7), 162.9,

162.8, 162.7, 162.6 (C-5, -4'), 158.3, 157.7 (C-9), 130.1, 129.7 (C-2', -6'), 123.7, 123.7 (C-1'), 117.0, 117.1 (C-3', -5'), 105.8, 106.1 (C-1''), 105.8, 105.6, 105.1, 104.4 (C-8, -10), 103.8, 104.0 (C-3), 99.5, 100.8 (C-6), 82.9, 82.9 (C-5''), 81.7, 82.4 (C-2''), 80.2, 79.8 (C-3''), 77.7, 77.9 (C-3''), 77.1, 77.5 (C-5''), 75.8, 76.1 (C-2''), 73.6, 74.9 (C-1''), 72.1, 71.3 (C-4''), 71.1, 71.3 (C-4''), 62.9, 62.6 (C-6''), 62.3, 62.5 (C-6'').

Quercetin (41)

Brown amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) δ : 12.26 (1H, s, OH-5), 7.81 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 7.69 (1H, dd, J=2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.98 (1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.51 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.25 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6).

Quercetin 3-O-glucoside (42)

Brown amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.70 (d, J=2.0 Hz, H-2'), 7.58 (dd, J=2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.86 (d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.38 (d, J=8.0 Hz, H-8), 6.19 (d, J=2.0 Hz, H-2), 5.25 (d, J=8.3 Hz, H-1''), 3.39-3.93 (H-2'', -3'', -6''), 3.30 (m, H-4''), 3.23 (m, H-5''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 179.5 (C-4), 166.3 (C-7), 163.1 (C-5), 159.0 (C-9), 158.5 (C-2), 149.9 (C-3'), 145.9 (C-4'), 135.6 (C-3), 123.2 (C-1'), 123.1 (C-6'), 117.5 (C-5'), 116.0 (C-2'), 105.6 (C-10), 104.3 (C-1''), 100.0 (C-6), 94.8 (C-8), 78.4 (C-5''), 78.1 (C-3''), 75.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 62.5 (C-6'').

Myricetin 3-O-glucoside (43)

Brown amorphous powder. MALDI-TOF-MS m/z: 503 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.29 (s, H-2', -6'), 6.38 (d, J=2.0 Hz, H-8), 6.20 (d, J=2.0 Hz, H-6), 5.25 (d, J=7.8 Hz, H-1''), 3.87-3.34 (H-2'', -3'', -4'', -5'', -6'' a, -6'' b); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 179.4 (C-4), 166.0 (C-7), 163.0 (C-5), 158.5

(C-2, -9), 146.4 (C-3', -5'), 138.1 (C-4'), 135.8 (C-3), 122.0 (C-1'), 110.0 (C-2', -6'), 104.5 (C-1''), 99.9 (C-6), 94.7 (C-8), 78.4 (C-3''), 78.2 (C-5''), 75.7 (C-2''), 71.1 (C-4''), 62.4 (C-6'').

(+)-Catechin (44)

Redbrown amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 2.48 (1H, dd, J=8.3, 16.1 Hz, H-4), 2.84 (1H, dd, J=5.4, 16.1 Hz, H-4), 3.95 (1H, ddd, J=5.4, 7.8, 8.3 Hz, H-3), 4.55 (1H, d, J=7.8 Hz, H-2), 5.84 (1H, d, J=2.2 Hz, H-8), 5.91 (1H, d, J=2.2 Hz, H-6), 6.71 (1H, dd, J=8.3, 2.0 Hz, H-6'), 6.75 (1H, d, J=8.3 Hz, H-5'), 6.82 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2').

(+)-Galocatechin (45)

Redbrown amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) δ : 2.48 (1H, dd, J=8.6, 16.1 Hz, H-4), 2.85 (1H, dd, J=5.7, 16.1 Hz, H-4), 3.92 (1H, ddd, J=5.7, 8.0, 8.6 Hz, H-3), 4.43 (1H, d, J=8.0 Hz, H-2), 5.82 (1H, d, J=2.4 Hz, H-8), 5.98 (1H, d, J=2.4 Hz, H-6), 6.43 (2H, s, H-2', 6').

(-)-Epicatechin 3-O-gallate (46)

Redbrown amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 6.94 (s, H-2'', -6''), 6.92 (d, J=6.8 Hz, H-2''), 6.79 (dd, J=2.0, 9.3 Hz, H-6'), 6.68 (d, J=7.8 Hz, H-5'), 5.95 (s, H-6, -8), 5.51 (m, H-3), 5.02 (s, H-2), 2.96 (dd, J=4.6, 17.3 Hz, H-4a), 2.84 (J=2.2, 17.2 Hz, H-4b).

Podomacrin A (47)

Yellow amorphous powder. [α]<sub>D</sub><sup>30</sup> +123.9 (c=0.1, MeOH). FAB-MS m/z: 267 [M+H]<sup>+</sup>, 289 [M + Na]<sup>+</sup>, 533 [2M+H]<sup>+</sup>. HRFAB-MS m/z: 267.1222 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>; 267.1232). IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3446, 2974, 2933, 1761. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra, see Table 9.

2''-O-(6''-O-acetyl glucosyl) vitexin (48)

Yellowish brown amorphous powder.  $[\alpha]_D^{20}$  -9.2 ( $c=0.1$ , MeOH). FAB-MS  $m/z$ : 637  $[M+H]^+$ , 659  $[M+Na]^+$ . HRFAB-MS  $m/z$ : 637.1798  $[M+H]^+$  (Calcd for  $C_{29}H_{33}O_{16}$ ; 637.1769). IR  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3365, 2919, 1718, 1653, 1609, 1576, 1508, 1436, 1360. UV  $\lambda_{max}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 215 (4.53), 270 (4.29), 330 (4.30).  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR spectra, see Table 10.

2' '-O-(6' '-O-acetyl glucosyl) scoparin (49)

Yellow brown amorphous powder.  $[\alpha]_D^{20}$  +18.7 ( $c=0.1$ , MeOH). FAB-MS  $m/z$ : 667  $[M+H]^+$ , 689  $[M+Na]^+$ . HRFAB-MS  $m/z$ : 667.1884  $[M+H]^+$  (Calcd for  $C_{30}H_{35}O_{17}$ ; 667.1874). IR  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3399, 2928, 1723, 1661, 1616, 1581, 1514, 1435, 1361. UV  $\lambda_{max}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 207 (4.48), 250 (4.08), 270 (4.08), 344 (4.16).  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR spectra, see Table 11.

Tricetin 4' -methyl ether 8-C-glucoside (50)

Pale yellow amorphous powder.  $[\alpha]_D^{21}$  -16.8 ( $c=0.1$ , DMSO). FAB-MS  $m/z$ : 479  $[M+H]^+$ , 501  $[M+Na]^+$ . HRFAB-MS  $m/z$ : 479.1196 (Calcd for  $C_{22}H_{23}O_{12}$ ; 479.1190). UV  $\lambda_{max}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 211 (4.15), 270 (3.78), 331 (3.73). IR  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3445, 2972, 2935, 1761, 1710, 1626, 1544, 1457.  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR spectra, see Table 12.

### 第3節に関する実験

イヌマキ種子 1.5 kg を MeOH および 50% 含水アセトンで抽出後、エーテル及び酢酸エチルで分配した。種子より得られた水可溶部について、各種カラムクロマトグラフィーで分離・精製した (Chart 5-3) 結果, **38** (19.8 mg), **51** (35.5 mg), **52** (27.9 mg), **53** (36.4 mg), **54** (6.4 mg), **55** (22.9 mg), **56** (5.5 mg), **44** (38.4 mg), **57** (10.5 mg), **45** (11.5 mg), **58** (80.1 mg), **59** (27.3 mg), **60** (205 mg), **61** (7.7 mg), **62** (19.1 mg), **63** (26.3 mg), **64** (5.4 mg), **65** (28.1 mg), **66** (31.8 mg) および **67** (85.5 mg) が得られた。

2' '-O-Rhamnosyl orientin (51)

Yellow amorphous powder. MALDI-TOF-MS  $m/z$ : 631  $[M+Na]^+$ ;  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.75 (dd,

$J=2.0, 8.0$  Hz, H-6'), 7.47 (d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.93 (d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 6.64 (s, H-3), 6.25 (s, H-6), 5.10 (s, H-1''), 5.01 (d,  $J=9.8$  Hz, H-1''), 4.31-3.00 (H-2''', -3''', -4''', -5'''), 3.96 (s, H-OCH<sub>3</sub>), 0.63 (d,  $J=6.3$  Hz, H-6''');  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 184.2 (C-4), 166.7 (C-2), 164.5 (C-7), 162.8 (C-5), 158.1 (C-9), 152.3 (C-3'), 149.5 (C-4'), 124.1 (C-1'), 123.0 (C-6'), 116.7 (C-5'), 111.2 (C-2'), 105.7 (C-10), 104.2 (C-8), 102.6 (C-3), 101.1 (C-1'''), 99.9 (C-6), 82.9 (C-5'), 81.5 (C-3'), 78.2 (C-2'), 74.1-71.1 (C-1'', -4'', C-2''', -3''', -4'''), 69.7 (C-5'''), 63.1 (C-6'), 57.2 (C-OCH<sub>3</sub>), 17.8 (C-6''').

3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (52)

Yellow amorphous powder. MALDI-TOF-MS  $m/z$ : 367  $[M+Na]^+$ ;  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.74 (d,  $J=1.8$  Hz, H-5), 6.64 (d,  $J=8.1$  Hz, H-2), 6.59 (dd,  $J=1.8, 8.1$  Hz, H-6), 4.20 (d,  $J=7.8$  Hz, H-1'), 3.77 (s, H-OCH<sub>3</sub>), 3.2-3.4 (m, H-7), 3.1-3.9 (H-2', -3', -4', -5', -6'), 2.59 (t,  $J=7.6$  Hz, H-9), 1.7-1.9 (m, H-8);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 148.8 (C-3), 145.5 (C-4), 134.9 (C-1), 121.9 (C-6), 116.1 (C-5), 113.3 (C-2), 104.5 (C-1'), 78.1 (C-5'), 78 (C-3'), 75.1 (C-2'), 71.7 (C-7), 70 (C-4'), 62.7 (C-6'), 56.4 (C-OCH<sub>3</sub>), 32.9 (C-8), 32.7 (C-9).

4-(3-Hydroxypropyl)-2-methoxyphenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (53)

White amorphous powder.  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.95 (d,  $J=8.3$  Hz, H-5), 6.78 (d,  $J=2.0$  Hz, H-2), 6.65 (dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz, H-6), 5.14-3.13 (H-2', -3', -4', -5', -6'), 4.80 (d,  $J=7.0$  Hz, H-1'), 3.72 (s, H-OCH<sub>3</sub>), 3.23 (t,  $J=6.6$  Hz, H- $\gamma$ ), 2.49 (t,  $J=7.3$  Hz, H- $\alpha$ ), 1.67 (m, H- $\beta$ );  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 148.8 (C-3'), 144.6 (C-4'), 136.1 (C-1'), 120.2 (C-6'), 113.3 (C-2', -5'), 100.4 (C-1'), 77.0 (C-5'), 76.9 (C-3'), 73.7 (C-2'), 70.2

(C-4'), 60.8 (C-9), 60.2 (C-6'), 55.7 (C-OCH<sub>3</sub>), 34.5 (C-8), 31.3 (C-7).

Icariside B5 (54)

White amorphous powder. MALDI-TOF-MS *m/z*: 411 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 5.82 (m, H-2), 4.3 (d, *J*=7.8 Hz, H-1''), 3.83 (m, H-3'), 3.10-3.90 (m, H-2', -3', -4', -5', -6), 2.61 (d, *J*=11.0 Hz, H-6a), 2.13 (dd, *J*=0.9, 18.0 Hz, H-6b), 2.03 (d, *J*=1.5 Hz, H-CH<sub>3</sub>), 1.98-2.08 (m, H-1' a), 1.82 (m, H-1' b), 1.78 (m, H-2' a), 1.48 (m, H-2' b), 1.17 (s, H-3' -CH<sub>3</sub>), 1.09 (s, H-5-CH<sub>2</sub>a), 1.01 (s, H-5-CH<sub>2</sub>b); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ: 197.7 (C-1), 168.6 (C-3), 126.3 (C-2), 102.3 (C-1''), 78.6 (C-4), 78.3 (C-5''), 78.0 (C-3''), 75.2 (C-3'), 74.9 (C-2''), 72.0 (C-4''), 63.0 (C-6''), 50.7 (C-6''), 42.2 (C-5''), 34.7, 33.2 (CH<sub>2</sub>), 24.7, 24.1, 21.6, 20.2 (CH<sub>3</sub>).

Nagilactone C (55)

White amorphous powder. MALDI-TOF-MS *m/z*: 385 [M+Na]<sup>+</sup>; CD (MeOH) Δ ε (nm): 0 (203), +88.9 (215), 0 (231), -19.4 (240), 0 (270), +10.7 (299). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ: 6.70 (s, H-11), 5.65 (d, *J*=8.5 Hz, H-7), 5.06 (dd, *J*=7.1, 8.5 Hz, H-6), 4.71 (d, *J*=6.0 Hz, H-3), 3.71 (m, H-1), 3.54-3.59 (m, H-2), 3.47 (m, H-15), 2.11 (s, H-20), 2.10 (d, *J*=7.1 Hz, H-5), 1.49 (s, H-18), 1.31, 1.24 (d, *J*=6.9 Hz, H-16, -17); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ: 177.7 (C-19), 170.4 (C-9), 165.2 (C-14), 162.1 (C-12), 111.8 (C-8), 107.3 (C-11), 73.7 (C-6), 67.9 (C-3), 60.2 (C-7), 58.2 (C-1), 51.5 (C-2), 51.3 (C-5), 50.2 (C-4), 38.1 (C-10), 29.7 (C-15), 26.2 (C-18), 20.7 (C-17), 20.1 (C-16), 19.3 (C-20).

(-)-Epicatechin (56)

White amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.95 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 6.82 (1H, dd, *J*=2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.75 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 5.92 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-6), 5.90 (1H,

d, *J*=2.2 Hz, H-8), 4.80 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, brs, H-3), 2.84 (1H, dd, *J*=4.4, 16.8 Hz, H-4), 2.72 (1H, dd, *J*=16.8, 2.9 Hz, H-4).

(-)-Epigallocatechin (57)

White amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) δ: 6.53 (2H, s, H-2', 6'), 5.98 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-6), 5.87 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-8), 4.74 (1H, brs, H-2), 4.14 (1H, brs, H-3), 2.78 (1H, dd, *J*=4.3, 16.6 Hz, H-4), 2.66 (1H, dd, *J*=3.4, 16.6 Hz, H-4).

Gallocatechin-(4α→8)-catechin (58)

Brown amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) δ: 6.99 (1H, brs, H-2' E), 6.82 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5' E), 6.74 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-6' E), 6.37 (2H, s, H-2' B, 6' B), 5.91 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-6A), 5.72 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-8A), 4.75 (1H, d, *J*=6.3 Hz, H-2F), 4.64 (1H, d, *J*=7.5 Hz, H-2C), 4.50 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4C), 4.42 (1H, m, H-3F), 4.20 (1H, dd, *J*=7.5, 9.5 Hz, H-3C), 2.85 (1H, dd, *J*=5.8, 16.1 Hz, H-4F), 2.53 (1H, dd, *J*=10.7, 16.1 Hz, H-4F); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) δ: 114.5 (C-2' E), 145.5 (2C, C-3' B, 5' B), 144.2 (C-4' E), 144.1 (C-3' E), 133.2 (C-4' B), 131.0 (C-1' E), 130.7 (C-1' B), 119.0 (C-6' E), 108.1 (2C, C-2B, 6B), 106.6 (C-8D), 95.7, 96.1, 96.7 (C-6A, 8A, 6D), 82.9 (C-2C), 80.2 (C-2F), 72.7 (C-3C), 67.1 (C-3F), 37.3 (C-4C).

Prodolphinidin B-4 (59)

Brown amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) δ: 6.66 (2H, s, H-2' E, 6' E), 6.55 (2H, s, H-2' B, 6' B), 6.01 (1H, s, H-6D), 5.79, 5.82 (2H, m, H-6A, 8A), 4.85 (1H, s, H-2F), 4.62 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-4C), 4.52 (1H, dd, *J*=7.8, 9.5 Hz, H-3C), 4.31 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-2C), 4.22 (1H, brs, H-3F), 2.86 (1H, m, H-4F), 2.82 (1H, m, H-4F); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) δ: 158.0 (C-8aA), 156.9 (C-5A), 155.6 (C-7D), 155.0 (C-5D), 154.4 (C-8aD), 145.8, 145.9 (C-3' B, 5' B, 3' E, 5' E), 133.3 (C-4' E), 132.5 (C-4' B), 131.3 (C-1' E),

131.1 (C-1' B), 107.9 (2C, C-2' B, 6' B), 107.4 (C-8D), 106.2 (2C, C-2' E, 6' E), 106.1 (C-4aA), 98.8 (C-4aD), 97.1 (C-6D), 97.0 (C-8A), 95.8 (C-6A), 83.2 (C-2C), 79.3 (C-2F), 73.0 (C-3C), 66.6 (C-3F), 37.8 (C-4C).

#### Prodelphinidin B-3 (60)

Redbrown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 6.56 (2H, s, H-2' B, 6' B), 6.53 (2H, s, H-2' E, 6' E), 6.02 (1H, s, H-6D), 5.89 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H-6A), 5.74 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H-8A), 4.57 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-2F), 4.51 (1H, d,  $J=8.3$  Hz, H-2C), 4.26 (1H, d,  $J=9.3$  Hz, H-4C), 3.95 (1H, m, H-3C), 3.85 (1H, m, H-3F), 2.93 (1H, dd,  $J=5.9, 16.1$  Hz, H-4F), 2.57 (1H, dd,  $J=8.9, 16.1$  Hz, H-4F);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 145.5, 145.6, 145.9, 146.0 (C-3' B, 5' B, 3' E, 5' E), 131.3, 131.4 (C-4' B, 4' E), 130.8, 130.9 (C-1' B, 1' E), 107.5 (C-8D), 107.0, 107.9 (C-2' B, 6' B, 2' E, 6' E), 97.0, 97.1 (C-6A, 6D), 96.6 (C-8A), 83.7 (C-2C), 82.8 (C-2F), 72.8 (C-3C), 68.1 (C-3F), 37.7 (C-4C).

#### Procyanidin B-1 (61)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 6.94 (2H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6' B, 6' E), 6.71 (2H, d,  $J=8.3$  Hz, H-3' B, 3' E), 6.66 (2H, dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz, H-2' B, 2' E), 5.95 (3H, br. d, H-6A, 6F, 8A), 5.03 (1H, brs, H-2C), 4.57 (1H, brs, H-4C), 3.97 (1H, brs, H-3F), 3.89 (1H, brs, H-3C), 2.78 (1H, dd,  $J=5.4, 16.1$  Hz, H-4F), 2.52 (1H, dd,  $J=7.3, 16.1$  Hz, H-4F);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 155.0, 155.6, 157.3, 158.0 (C-5A, 7A, 8aA, 5D, 7D, 8aD), 145.0, 145.1, 145.9 (C-3' B, 4' B, 3' E, 4' E), 131.2, 132.1 (C-1' B, 1' E), 119.1 (2C, C-6' B, 6' E), 115.1, 115.3 (C-2' B, 5' B, 2' E, 5' E), 106.9 (C-8D), 96.6 (C-8A), 95.3, 95.9 (C-6A, C-6D), 82.0 (C-2F), 76.6 (C-2C), 72.4 (C-3C), 67.7 (C-3F), 36.5 (C-4C).

#### Epigallocatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin (62)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,

acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 6.83 (1H, brs, H-2' B), 6.71 (1H, d,  $J=9.3$  Hz, H-6' E), 6.69 (1H, d,  $J=9.3$  Hz, H-5' E), 6.46 (2H, s, H-2' B, 6' B), 5.94, 5.98 (2H and 1H, respectively, each brs, H-6A, 8A, 6D), 4.98 (1H, brs, H-2C), 4.88 (1H, brs, H-2F), 4.61 (1H, brs, H-4C), 4.09 (1H, brs, H-3F), 3.91 (1H, brs, H-3C), 2.69 (1H, m, H-4F), 2.57 (1H, m, H-4F);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 155.1, 155.6, 157.3, 158.2 (C-5A, 7A, 8aA, 5D, 7D, 8aD), 145.1, 145.3, 145.9 (C-3' B, 4' B, 3' E, 4' E), 131.4, 131.8 (C-1' B, 1' E), 119.2 (2C, C-6' B, 6' E), 115.6 (C-2' B, 2' E), 114.5 (C-5' E), 106.7 (C-8D), 96.6 (C-8A), 95.3, 95.9 (C-6A, 6D), 81.6 (C-2F), 76.6 (C-2C), 72.3 (C-3C), 67.6 (C-3F), 36.5 (C-4C).

#### Prodelphinidin B-1 (63)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 6.39, 6.50 (4H, m, H-2' B, 6' B, 2' E, 6' E), 5.92, 6.00 (3H, m, H-6A, 8A, 6D), 4.96 (1H, brs H-2C), 4.70 (1H, m, H-2F), 4.60 (1H, brs, H-4C), 4.01 (1H, brs, H-3F'), 3.90 (1H, brs, H-3C), 2.80 (1H, dd,  $J=5.4, 16.3$  Hz, H-4F), 2.55 (1H, dd,  $J=7.8, 16.3$  Hz, H-4F).

#### Prodelphinidin A-1 (64)

Brown amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 6.71 (2H, s, H-2' B, 6' B), 6.57 (2H, s, H-2' E, 6' E), 6.11 (1H, s, H-6D), 5.98, 6.03 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-6A, 8A), 4.51 (1H, d,  $J=8.8$  Hz, H-2F), 4.16 (1H, d,  $J=3.4$  Hz, H-3C), 4.08 (1H, d,  $J=3.4$  Hz, H-4C), 4.08 (1H, m, H-3F), 3.01 (1H, dd,  $J=5.8, 15.8$  Hz, H-4F), 2.53 (1H, dd,  $J=9.3, 15.8$  Hz, H-4F);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6+D_2O$ )  $\delta$ : 151.0, 151.7, 153.7, 155.4, 156.0, 157.6 (C-5A, 7A, 8aA, 5D, 7D, 8aD), 129.1, 131.2 (C-1' B, 6' B), 106.2 (C-8A), 103.6 (C-2C), 97.6 (C-8D), 96.3 (C-6A), 84.6 (C-2F), 66.9, 67.3 (2C, C-3C, 3F), 28.5 (2C, C-4C, 4F).

#### Gallocatechin-(4 $\alpha$ →8)-gallocatechin-(4 $\alpha$ →8)-gallocatechin (65)

化合物 **65** は gallocatechin の三量体であり,

<sup>1</sup>H-NMR スペクトルがブロードに検出された。これは、回転障害によるものと推定されるので、次に示す条件でアセチル化を行い、誘導体化した。10 mg を無水酢酸/ピリジンで処理後、silica gel (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 100:0 ~ 95:5) で精製することにより **65a** (4.9 mg) を得た。この **65a** について、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを文献値と比較することにより同定した。

White amorphous powder. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.93 (2H, s, H-2' and H-6' E), 6.65 (1H, s, H-6G), 6.62 (4H, s, H-2' and H-6' B and H), 6.55 (1H, s, H-6D), 6.52 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-8A), 6.32 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-6A), 5.54 (1H, t, *J*=9.3, 9.6 Hz, H-3C), 5.35 (1H, dd, *J*=8.6, 10.0 Hz, H-3F), 5.21 (1H, brs, H-2I), 5.16 (1H, m, H-3I), 4.75 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-2F), 4.65 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-2C), 4.54 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-4F), 4.17 (1H, d, *J*=9.3 Hz, H-4C), 2.53-2.58 (2H, m, H-4I), 1.23-2.33 (s, 3×aliphatic and 15×phenolic OAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 156.3 (C-8aA), 151.0 (C-8aG), 150.0 (C-7A), 149.3 (C-5G), 147.3 (C-5D), 147.2 (C-7D), 143.1 (2C, C-3' and C-5' E), 143.0 (4C, C-3' and C-5' B and H), 136.7 (C-1' H), 134.9 (C-1' E), 134.8 (2C, C-1' B and C-4' H), 134.7 (C-4' E), 134.3 (C-4' B), 124.5 (C-6' E), 119.4 (C-2' E), 119.1 (4C, C-2' and C-6' B and H), 118.4 (C-8D), 117.1 (C-4aD), 117.0 (C-4aA), 116.5 (C-8G), 110.6 (C-6D), 109.7 (C-6A, C-4aG), 108.4 (C-6G), 108.1 (C-8A), 79.4 (C-2F), 78.6 (C-2C), 72.9 (C-3F), 70.6 (C-3C), 66.2 (C-3I), 36.9 (C-4C), 36.7 (C-4F), 29.3 (C-4I).

#### Nagilactone A 1-*O*-β-D-glucopyranoside (66)

White amorphous powder. [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> · 32.0 (c=0.1, MeOH). FAB-MS *m/z*: 511 [M+H]<sup>+</sup>, 349 [M-Glc+H]<sup>+</sup>. HR-FAB-MS *m/z*: 511.2191 (Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>O<sub>11</sub>: 511.2179). UV λ<sub>max</sub> nm (log ε): 204 (3.87), 255 (3.28), 298 (3.46). CD (MeOH) Δε (nm): 0 (202), +55.4 (215), 0 (231), -12.0 (240), 0 (262), +5.46 (292). IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1767, 1699, 1627, 1544. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra, see Table 13.

#### Nagilactone C 7-*O*-β-D-apiofuranoside (67)

White amorphous powder. [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> · 50.1 (c=0.11, MeOH). FAB-MS *m/z*: 495 [M+H]<sup>+</sup>, 363 [M-Api-H]<sup>+</sup>. HRFAB-MS *m/z*: 495.1880 (Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>O<sub>11</sub>: 495.1866). UV λ<sub>max</sub> nm (log ε): 203 (4.18), 296 (3.71). IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1761, 1710, 1626, 1544. CD (MeOH) Δε (nm): 0 (204), +71.0 (211), 0 (230), -14.9 (244), 0 (263), +14.4 (297). <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra, see Table 14.

#### Nagilactone A 1-*O*-β-D-glucopyranoside (66)

#### および nagilactone C 7-*O*-β-D-apiofuranoside (67) の糖部分の絶対構造

**66** と **67** の糖部分の絶対構造については、**66** と **67** それぞれ (5 mg) に 0.1 M HCl (1 ml) を加えて 100 ° C で 5 時間処理して酸加水分解後、Amberlite IRA400 (OH form) を加え中和した後、ろ過して樹脂を除き、ろ液を乾燥させた。残渣は L-cysteine methyl ester (5 mg) とともに pyridine (0.5 ml) に溶解し、60 ° C で 1 時間加熱した。さらに、*o*-torylisothiocyanate (5 mg) を pyridine (0.5 ml) に溶かしたものを加え、60 ° C で 1 時間加熱した。反応液を HPLC 分析 [Cosmosil 5C<sub>18</sub>AR II; 25% CH<sub>3</sub>CN in water containing 50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; flow rate, 0.8 ml/min; detection, 250 nm] した結果、化合物 **66** から得た glucose の誘導体は、*t*<sub>R</sub>=18.7 min に検出され、D- glucose (*t*<sub>R</sub>=18.7 min)、および L-glucose (17.2 min) の標品から合成した誘導体と比較して D- glucose であると決定した。また、化合物 **67** から得た apiose の誘導体は、*t*<sub>R</sub>=31.3 min に検出され、D- apiose の誘導体 (*t*<sub>R</sub>=31.0 min)、および L- apiose の誘導体 (*t*<sub>R</sub>=16.8 min) の *t*<sub>R</sub> 値と比較して D- apiose であると決定した。

#### プロアントシアニジンオリゴマーのチオール分解

種子および果托のプロアントシアニジンオリゴマーを 60% EtOH (25 mg/ml) に溶解し、その溶液 (300 μl) にメルカプトエタノール試薬 [(メルカプトエタノール-EtOH-希塩酸-H<sub>2</sub>O, 2.5:27.5:4:16), 1.2 ml] を加え、75 ° C で 7 時間処理した。室温まで冷ました後、反応液 (10 μl) を HPLC 分析に供した。



## 第7章に関する実験

Eritadenine (**68**)の標準品は斉藤ら (1975)の方法を一部改変して得た (Chart 6-2). 乾燥したシイタケ (110 g)を 80% 含水 MeOH (2.5 l)で3回抽出し, エキスを合わせ, 減圧濃縮後, 水溶液とした. その水溶液に EtOH を加え, 80% EtOH とし,  $-4^{\circ}\text{C}$  で 24 時間保冷した. 沈殿物をろ過して除去し, ろ液をエーテル (1.0 l)で2回溶媒分配し, 水溶液を得た. その水溶液を Dowex 50W $\times$ 8 (0.3 N HCl, 1 N HCl), 次いで Dowex 1 $\times$ 8 (0.03 N HCOOH) で分離した. 得られた Fr. 22 を, Chromatorex NH (Fuji Silysia Chemical LTD.) カラムクロマト (2 cm i.d.  $\times$  25 cm; 80-45% aq  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 5% stepwise)に付し **68** (69.4 mg)を得た. **68** は TLC および HPLC の UV 吸収 (260 nm)で確認し,  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを文献値と比較することによって同定した.

シイタケ菌床栽培の培地基材として使用した樹種は, アラカシ, クヌギ, スダジイ, タブノキ, マテバシイ, サクラ, クロキであり, チッパーシュレッダーで約 4 mm に粉砕したものを用了. 菌床栽培は, (有) ナガハシにおいて, 北研 600 号の種菌を用いて行った. シイタケ菌の培養及び発生操作については, 樹種ごとに粉砕したチップを3日間散水後, 菌床栽培用ブロックに成形した.  $120^{\circ}\text{C}$  で滅菌, 放冷後, 種菌を接種し, 90 日間培養後, 発生したものを採集した (Chart 6-1).

各菌床ブロックから得た子実体の傘 200 mg を 8 ml の  $\text{H}_2\text{O}$  で 30 min 熱水抽出した. 抽出液は, メンブランフィルターでろ過後, Cosmosil HILIC カラム (250  $\times$  4.6 mm, Nacalai Tesque Inc.,

Japan)を用いて HPLC に供し, カラム温度は  $35^{\circ}\text{C}$ , 溶媒は  $\text{CH}_3\text{CN}$ -50 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を用い, 21 min で 90-76%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , さらに 4 min で 76-50%  $\text{CH}_3\text{CN}$  のグラジエントで溶出した. **68** は  $t_{\text{R}} = 16.7$  min, guanosine monophosphate は  $t_{\text{R}} = 20.0$  min で検出された. **68** の検量線は, 4 種類の濃度 (0.00625, 0.0125, 0.0025, 0.05 mg/ml)を2反復測定し, HPLC のピーク面積との回帰式 (決定係数:0.9991)を算出して作成した.

算出した eritadenine 含有量については, 一元配置分散分析を行った. 群間で有意差があった場合は, 各群の平均値について多重比較法である Holland & Copenhaver の方法により検定した.

Eritadenine (**68**)

Colorless amorphous powder.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.10 (1H, s, H-aromatic), 8.03 (1H, s, H-aromatic), 7.14 (2H, br, H-NH<sub>2</sub>), 4.38-3.70 (4H, m, H-CH, -CH<sub>2</sub>).

引用文献

- 1) 長崎県, “長崎県の林業統計”, 2010, 153pp.
- 2) 伊藤秀三, “長崎県の植生”, 長崎県, 1977, 147pp.
- 3) 伊藤秀三, “長崎県の森林と樹木”, 長崎県, 1990, 157pp.
- 4) 林野庁, “平成 22 年度版 森林・林業白書”, 社団法人全国林業改良普及協会, 2010, 145pp.
- 5) 樋口隆昌, “木質生化学”, 文永堂出版, 東京, 1993, 246pp.
- 6) Tanaka T., *YAKUGAKU ZASSHI*, **128**, 1119-1131 (2008).
- 7) 吉田隆志, 有井雅幸, “植物ポリフェノール含有素材の開発 -その機能と安全性-”, シーエムシー出版, 東京, 2007, 337pp.
- 8) Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., *Trends Plant Sci.*, **2**, 152-159 (1997).
- 9) Folin O., Ciocalteu V., *J. Biol. Chem.*, **78**, 627-650, (1927).
- 10) Rayne S., Mazza G., *Plant Foods Hum Nutr.*, **62**, 165-175 (2007).
- 11) Trukmen N., Sari F., Sedat Y. V., *Food Chem.*, **99**, 835-841 (2006).
- 12) Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D., *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4113-4177 (1998).
- 13) Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M., *Food Chem.*, **94**, 550-557 (2006).
- 14) Tzulker R., Glazer I., Bar-Ilan I., Holland D., Aviram M., Amir R., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9559-9570 (2007).
- 15) Maeda H., Kakoki N., Ayabe M., Koga Y., Oribe T., Matsuo Y., Tanaka T., Kouno I., *Phytochemistry*, **72**, 796-803 (2011).
- 16) 李時珍, “本草綱目 34 卷 -木部香木-”, 1596.
- 17) 貝原益軒, “大和本草 12 卷 -木部雑木類-”, 1709.
- 18) 諸戸北郎, “大日本有用樹木効用編”, 財団法人林業科学技術振興所, 1903, 330pp.
- 19) “有用広葉樹の知識”, 財団法人林業科学技術振興所, 1985, 514pp.
- 20) Tanaka T., Kouno I., *J. Nat. Prod.*, **59**, 997-999 (1996).
- 21) Bohmann F., Zdero C., *Chem. Ber.*, **109**, 2021-2025 (1976).
- 22) Kubo I., Muroi H., Kubo A., Chaudhuri S. K., Sanchez Y., Ogura T., *Planta Med.*, **60**, 218-221 (1994).
- 23) Haraguchi H., Ishikawa H., Sanchez Y., Ogura T., Kubo Y., Kubo I., *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 865-874 (1997).
- 24) Rocha-González H. I., Blaisdell-López E., Granados-Soto V., Navarrete A., *Eur. J. Pharmacol.*, **649**, 154-160 (2010).
- 25) Takeda R., Ohta Y., Hirose Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 1120-1124 (1983).
- 26) Asakawa Y., Toyota M., Taira Z., Takemoto T., Kido M, Ichikawa Y., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1232-1233 (1980).
- 27) Bohlmann F., Zdero C., Ahmed M., *Phytochemistry*, **21**, 1679-1691 (1982).
- 28) Mata R., Rojas A., Soriano M., Villena R., Bye R., Linares E., *Heterocycles*, **31**, 1111-1114 (1990).
- 29) Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092-4096 (1991).
- 30) Snatzke G., *Tetrahedron*, **21**, 439-448 (1965).
- 31) Jadwiga F., Wojciech J.S., Hans P. W., *Tetrahedron: Asymmetry*, **6**, 1419-1430 (1996).
- 32) Frelek J., Szczepiek W. J., Neubrech S., Schultheis B., Brechtel J., Kuball H.-G., *Chem. Eur. J.*, **8**, 1899-1907 (2002).
- 33) 吉儀英記, “香料入門”, フレグランスジャーナル社, 東京, 2002, 483pp.
- 34) Nishizawa M., Yamagishi T., Nonaka G., Nishioka I., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2963-2968 (1982).
- 35) Nonaka G., Harada M., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 685-687 (1980).

- 36) Schmidt O. T., Würtele L., Harréus A., *Liebigs Ann. Chem.*, **690**, 150-162 (1965).
- 37) Gupta R. K., Al-Shafi S. M., Laiden K., Haslam E., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2525-2534 (1982).
- 38) Okuda T., Yoshida T., Ashida M., Yazaki K., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1765-1772 (1983).
- 39) Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *J. Chem. Res. M.*, 2001-2029 (1985).
- 40) Okuda T., Yoshida T., Ashida M., Yazaki K., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1765-1772 (1983).
- 41) Kunitomo J., Juuchi M., Ando Y., Yoshikawa Y., Nakamura S., Shingu T., *YAKUGAKU ZASSHI*, **95**, 445-447 (1975).
- 42) Tanaka T., Jiang Z., Kouno I., *Phytochemistry*, **47**, 851-854 (1998).
- 43) Tanaka T., Nakashima T., Ueda T., Tomii K., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 899-901 (2007).
- 44) Barbehenn R. V., Jones C. P., Hagerman A. E., Karonen M., Salminen J. P., *J. Chem. Ecol.*, **32**, 2253-2267 (2006).
- 45) Sarni F., Moutounet M., Puech J., Rabier P., *Holzforschung*, **44**, 461-466 (1990)
- 46) Maeda H., Matsuo Y., Tanaka T., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 421-423 (2009).
- 47) Kosuge S., Maekawa T., Saito C., Tanaka T., Kouno I., Ohtsuki K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 403-409 (2001).
- 48) Ueno T., Miyanaga T., Kawakami F., Okano M., Tanaka T., Ohtsuki K., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1401-1404 (2002).
- 49) Bate-Smith E. C., *Phytochemistry*, **11**, 1153-1156 (1972).
- 50) Ikeya Y., Taguchi H., Yosioka I., Kobayashi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1383-1394 (1979).
- 51) Okuda T., Yoshida T., Hatano T., *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **66**, 1-117 (1995).
- 52) Yoshida T., Tanaka K., Chen X.-M., Okuda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 920-924 (1989).
- 53) Ahmed A., Memon M., Yoshida T., Okuda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 254-264 (1994).
- 54) Hatano T., Yoshihara R., Hattori S., Yoshizaki M., Shingu T., Okuda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1703-1710 (1992).
- 55) Lee S.-H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 630-638 (1991).
- 56) Ishimatsu M., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., Nishizawa M., Yamagishi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1735-1743 (1989).
- 57) Ishimatsu M., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., Nishizawa M., Yamagishi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 129-134 (1989).
- 58) Okuda T., Yoshida T., Kuwahara M., Memon M. U., Shingu T., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2165-2173 (1984).
- 59) Nawwar, M. A. M., Buddrusa, J., Bauera, H., *Phytochemistry*, **21**, 1755-1758 (1982).
- 60) Sato T., *Phytochemistry*, **26**, 2124-2125 (1987).
- 61) Khac D. D., Tran-Van S., Campos A. M., Lallemand J. Y., Fetizon M., *Phytochemistry*, **29**, 251-256 (1990).
- 62) Kondo R., Imamura H., *Mokuzai Gakkaishi*, **31**, 927-934 (1985).
- 63) Valianou L., Stathopoulou K., Karapanagiotis I., Magiatis P., Pavlidou E., Skaltsounis A.-L., Chrysosoulakis Y., *Anal Bioanal Chem*, **394**, 871-882 (2009).
- 64) Ding Y., Nguyen H. T., Choi E. M., Bae K., Kim Y. H., *Planta Med.*, **75**, 158-162 (2009).
- 65) Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., Ferro-Luzzi A., *Free Radical Biol. Med.*, **18**, 29-36 (1995).
- 66) Glazer A. N., *Methods Enzymol.*, **186**, 161-168 (1990).
- 67) Cao G., Alessio H. M., Cutler R. G., *Free Radical Biol. Med.*, **14**, 303-311 (1993).
- 68) Naguib Y. M. A., *Anal. Biochem.*, **284**, 93-98 (2000).
- 69) Prior R. L., Wu X., Schaich K., *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302 (2005).
- 70) Ferreira D., Merwe J. P., Roux D. G., *J.*

- Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1492-1498 (1974).
- 71) Kim J. -S., Kwon Y. -S., Chun W. -J., Kim T. -Y., Sun J., Yu C. -Y., Kim M. -J., *Food Chem.*, **120**, 539-543 (2010).
- 72) Encarnación D. R., Nogueiras C. L., Salinas V. H. A., Anthoni U., Nielsen P. H., Christophersen C., *Acta Chem. Scand.*, **53**, 1375-1377 (1999).
- 73) Júnior G. M. V., Sousa C. M. M., Cavaleiro A. J., Lago J. H. G., Chaves M. H., *Helv. Chim. Acta*, **91**, 2159-2167 (2008).
- 74) Mathew J., Rao A. V. S., *Phytochemistry*, **22**, 794-795 (1983).
- 75) Zhaoa W. -H., Gaob C. -C., Mac X. -F., Baia X. -Y., Zhang Y. -X., *J. Chromatogr. B.*, **850**, 523-527 (2007).
- 76) Nonaka G., Nishioka I., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 2963-2968 (1982).
- 77) Lee J. -C., Lim K. -T., Jang Y. -S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1570**, 181-191 (2002).
- 78) Park K. -Y., Jung G. -O., Lee K. -T., Choi J., Choi M. -Y., Kim G. -T., Jung H. -J., Park H. -J., *J. Ethnopharmacol.*, **90**, 73-79 (2004).
- 79) Lee J. -C., Lee K. -Y., Kim J., Na C. -S., Jung N. -C., Chung G. -H., Jang Y. -S., *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 1383-1388 (2004).
- 80) Lee E. H., Song D. -G., Lee J. Y., Pan C. H., Um B. H., Jung S. H., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1626-1630 (2008).
- 81) Malan E., Pienaar D. H., *Phytochemistry*, **26**, 2049-2051 (1987).
- 82) Prior R. L., Cao G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 225-261 (1999).
- 83) Cao G., Sofic E., Prior R. L., *Free Radical Biol. Med.*, **22**, 749-760 (1997).
- 84) Jung C. H., Jun C. -Y., Lee S., Park C. -H., Cho K., Ko S. -G., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1603-1607 (2006).
- 85) 社団法人木材保存協会, “木材保存学入門改訂版”, 東京, 2001, 356pp.
- 86) Sato K., Sugawara K., Takeuchi H., Park H. -S., Akiyama T., Koyama T., Aoyagi Y., Takeya K., Tsugane T., Shimura S., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1691-1697 (2008).
- 87) Sato K., Inaba Y., Park H. -S., Akiyama T., Koyama T., Fukata H., Aoyagi Y., Takeya K., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 668-679 (2009).
- 88) Sato K., Sugawara K., Takeuchi H., Park H. -S., Akiyama T., Koyama T., Fukata H., Aoyagi Y., Takeya K., *Heterocycles*, **78**, 1453-1462 (2009).
- 89) 橋本郁三, “食べられる野生植物大事典”, 柏書房, 東京, 2003, 484pp.
- 90) Lee J. H., Kang N. S., Shin S. O., Shin S. H., Lim S. G., Srh D. Y., Baek I. Y., Park K. Y., Ha T. J., *Food Chem.*, **112**, 226-231 (2009).
- 91) Kondo T., Oyama K., Nakamura S., Yamakawa D., Tokuno K., Yoshida K., *Org. Lett.*, **8**, 3609-3612 (2006).
- 92) Fossen T., Øvstedal D. O., *Phytochemistry*, **63**, 783-787 (2003).
- 93) Li J. -B., Hashimoto F., Shimizu K., Sakata Y., *Phytochemistry*, **69**, 3166-3171 (2008).
- 94) Rayyan S., Fossen T., Nateland S. H., Andersen Ø. M., *Phytochem. Anal.*, **16**, 334-341 (2005).
- 95) Xu L. -Z., Chen Z., Sun N. -J., *Acta Bot. Sin.*, **35**, 138-143 (1993).
- 96) Isayenkova J., Wray V., Nimitz M., Strack D., Vogt T., *Phytochemistry*, **67**, 1598-1612 (2006).
- 97) Kazuma K., Noda N., Suzuki M., *Phytochemistry*, **62**, 229-237 (2003).
- 98) 津田孝範, 須田郁夫, 津志田藤二郎 編著, “アントシアニンの科学 -生理機能・製品開発への新展開-”, 建帛社, 東京, 2009, 296pp.
- 99) Escobar L. K., Liu Y. L., Mabry T. J., *Phytochemistry*, **22**, 796-797 (1983).
- 100) Akita H., Kawahara E., Kishida M., Kato K., *J. Mol. Cat. B.*, **40**, 8-15 (2006).
- 101) Masur M., Ross K. H., Kadla J. F., *J. Wood Chem. Technol.*, **27**, 1-8 (2007).
- 102) Andersson R., Lundgren L. N., *Phytochemistry*, **27**, 559-562 (1988).

- 103) Miyase T., Ueno A., Takizawa N., Kobayashi H., Oguchi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2475-2484 (1988).
- 104) Hayashi Y., Matsumoto T., Uemura M., Koreeda M., *Org. Magn. Reson.*, **14**, 86-91 (1980).
- 105) Ito S., Kodama M., Sunagawa M., Honma H., Takahashi T., *Tetrahedron Lett.*, **34**, 2951-2954 (1969).
- 106) Sun D., Wong H., Foo L. Y., *Phytochemistry*, **26**, 1825-1829 (1987).
- 107) Foo L. Y., Lu Y., Molan A. L., Woodfield D. R., McNabb W. C., *Phytochemistry*, **54**, 539-548 (2000).
- 108) Saijo R., Nonaka G., Nishioka I., *Phytochemistry*, **28**, 2443-2446 (1989).
- 109) Nonaka G., Nishioka I., Nagasawa T., Oura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2862-2870 (1981).
- 110) Tanaka T., Inoue K., Kouno I., *Nat. Prod. Res.*, **19**, 731-737 (2005).
- 111) Lee M.-W., Morimoto S., Nonaka G., Nishioka I., *Phytochemistry*, **31**, 2117-2120 (1992).
- 112) Zhang Y., Tanaka T., Iwamoto Y., Yang C.-R., Kouno I., *J. Nat. Prod.*, **63**, 1507-1510 (2000).
- 113) Santos S. C., Waterman P. G., *Fitoterapia*, **71**, 610-612 (2000).
- 114) Tits M., Angenot L., Poukens P., Warin R., Dierckxsens Y., *Phytochemistry*, **31**, 971-973 (1992).
- 115) Kitagawa I., Sakagami M., Hasiuchi F., Zhou J. L., Yosikawa M., Re J., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 551-553 (1989).
- 116) Tanaka T., Takahashi R., Kouno I., Nonaka G., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 3013-3022 (1994).
- 117) 常田文彦, 渋川尚武, 安元健, 金田尚志, *栄養と食糧*, **24**, 92-95 (1971).
- 118) Sugiyama K., Akachi T., Yamakawa A., *J. Nutr.*, **125**, 2134-2144 (1995).
- 119) Sugiyama K., Akachi T., Yamakawa A., *J. Nutr. Biochem.*, **6**, 80-87 (1995).
- 120) Sugiyama K., Yamakawa A., Saeki S., *Lipids*, **32**, 859-866 (1997).
- 121) 豊増哲郎, *財団法人日本きのこ研究所試験研究業務報告*, **29**, 10-25 (2002).
- 122) 豊増哲郎, *財団法人日本きのこ研究所試験研究業務報告*, **30**, 21-23 (2003).
- 123) Yoshimoto H., Eguchi F., Higaki M., Ohga S., *Mokuzai Gakkaishi*, **51**, 387-393 (2005).
- 124) Sasaki H., Aoyagi Y., Kasuga A., Tanaka Y., Matsuzawa M., Kawai H., *日本食品工業学会誌*, **42**, 471-477 (1995).
- 125) 北研食用菌類研究所, “菌床シイタケのつくり方”, 大森清寿 編, 社団法人農山漁村文化協会, 東京, 1993, 206pp.
- 126) 斉藤衛郎, 安元健, 金田尚志, *栄養と食糧*, **28**, 503-505 (1975).
- 127) 青柳康夫, 正田悦子, 菅原龍幸, *栄養と食糧*, **29**, 460-461 (1976).
- 128) Kamiya T., Saito Y., Hashimoto M., Seki H., *Tetrahedron*, **28**, 899-906 (1972).
- 129) Kamiya T., Saito Y., Hashimoto M., Seki H., *Tetrahedron Lett.*, **53**, 4729-4732 (1969).
- 130) Chibata I., Okumra K., Taketama S., Kotera K., *Cell. Mol. Life Sci.*, **25**, 1237-1238 (1969).
- 131) Itoh H., Morimoto T., Kawashima K., Chibata I., *Cell. Mol. Life Sci.*, **29**, 271 (1973).
- 132) Holland B. S., Copenhaver M. D., *Biometrics*, **43**, 417-423 (1987).
- 133) 永田靖, 吉田道弘, “統計的多重比較法の基礎”, サイエンスティスト社, 東京, 1997, 187pp.

## Exploration of functional chemical compounds in Nagasaki forest resources

Hajime MAEDA

### SUMMARY

The Nagasaki Prefectural Office is promoting studies on agricultural resources which contribute to revitalization of local economy. In recent years, our efforts are focused on utilization of prefectural resources as the functional materials. This is also a global trend in the fields of agriculture, forestry and fisheries.

"Forest" has been attracting attention as one of the resources having the functional materials. The functional materials in Nagasaki are include wood of Sugi (*Cryptomeria japonica*) and Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*), mushrooms, such as Siitake mushroom (*Lentinula edodes*), and high-grade Camellia (*Camellia japonica*) seed oil mainly produced in Goto Islands. When the materials are used as construction materials or foods, visual characteristics such as shape and hue are criteria of the commercial value; however, the plant materials contains many promising natural chemical compounds having various functions, such as health benefits or antibacterial activities. Thus, we investigated chemical constituents of selected plant resources collected in Nagasaki area to accumulate fundamental chemical information that contribute to develop new applications of the natural products in the plant resources in Nagasaki prefecture.

Plants examined in this study, such as trees and mushrooms, were collected in Nagasaki prefecture, and the constituents were extracted and separated in the Laboratory of Natural Product Chemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University.

The first chapter is introduction and describes back ground of the study as mentioned above and brief introduction of the plants examined in this study.

In the chapter 2, polyphenols in the plant samples (including leaves, bark, sapwood and heartwood) of 46 species belonging 35 genus and 26 families were compared by Folin-Ciocalteu method for total polyphenol content and HPLC analysis. The results indicated that total polyphenols of the plants belonging Anacardiaceae, Elaeocarpaceae, Myricaceae, and Juglandaceae were higher than those of other families. In addition, some plants exhibited different polyphenol compositions in the leaves, bark, sapwood and heartwood.

Chapter 3 describes the chemical composition of the wood of *Platycarya strobilacea* (PSW), which is a fragrant tree and has been used as a substitute for expensive agarwood (*Aquilaria agallocha*). PSW was burned when it is used as fragrant tree, and the aim of our study is characterization of the aroma substance and chemical change of the constituents during the heating. Previously, we reported that PSW contains 3-hydroxy- $\alpha$ -calacorene, oak lactone (syn. whisky lactone) precursor, gallotannins, such as pentagalloyl- $\beta$ -D-glucose, and ellagitannins, such as pedunculagin, casuariin, casuarinin, eugeniin, 1( $\beta$ )-*O*-galloylpedunculagin. First we demonstrated presence of three new eudesman-type sesquiterpenoids, and the structures were elucidated by spectroscopic methods. These terpenoids are detected in the smoke when the PSW was toasted. As for degradation of other phenolic compounds on toasting, ellagitannins are completely disappeared, whereas the

gallotannins and oak lactone precursor remained unchanged. Gallic acid and ellagic acid increased, and *m*-digallate, sinapylaldehyde, coniferylaldehyde, vanillin, and 3'-*O*-methylellagic acid 4-*O*-(4'-*O*-galloyl)-xyloside were newly generated on toasting.

Chapter 4 describes a new ellagitannin dimer named euscaphinin isolated from the leaves of *Euscaphis japonica* (THUNB.) KANITZ. The structure was determined on the basis of spectroscopic and chemical evidence. The dimer was produced by intermolecular C-O oxidative coupling between the galloyl groups of two molecules of 1( $\beta$ )-*O*-galloyl pedunculagin, which is the major ellagitannin of the leaves and known to be a selective inhibitor of the  $\beta$ -regulatory subunit of A-kinase. The ellagitannins are not detected in the bark and wood of the plant. This is the first example of isolation of ellagitannins from *Staphyleaceae* plants.

In chapter 5, the wood of *Rhus sylvestris* Sieb. Et Zucc. was analyzed in detail. The characteristic yellow pigment in the heartwood was identified as sulphuretin. In addition, the main constituents of the heartwood were characterized to be fustin, polygalloyl- $\beta$ -D-glucoses, and two new compounds, which were determined to be 3-*O*-galloyl fustin and 3', 4' -*O*-galloyl fustin. Antioxidant activity of heartwood constituents was compared by ORAC, the values of fustin, 2, 3', 4', 6-tetrahydroxy-2-benzylcoumarone, 3-*O*-galloyl fustin, 3' (4' )-*O*-galloyl fustin were higher than that of gallic acid.

In chapter 6, fruit of *Podcarpus macrophyllus* was examined. The fruits were composed of seed and fruit receptacles, and it is known that seeds were toxic and fruit receptacles were edible. The constituents of the fruit had not been analyzed so far. The main components of fruit receptacles were polysaccharide and minor constituents were characterized to be 3 anthocyanins, 5 flavone C-glycosides, and 4 new compounds, which were composed of three flavonoid C-glycosides and a nor-sesquiterpen. The edible fruit receptacles did not contain nor-diterpenoid dilactones. The nor-diterpenoid dilactones were obtained from the seed. The seed was contained 3 flavone C-glycosides, 2 nor-diterpenoid dilactone glycoside. Proanthocyanidins were obtained from fruit receptacles and seed, and the structural subunits were determined to be catechol and pyrogallol-type catechins.

In chapter 7, eritadenine content of *Lentinula edodes* (Shiitake mushroom) cultivated with various woodchip were compared. In this study, I developed a new facile method to determine eritadenine concentration by application of HILIC-mode HPLC using aminopropylsilyl silica gels. The mushroom cultivated with *Machilus thunbergii* woodchip showed the highest concentration of eritadenine among the samples cultivated with 7 different woodchips.

The forest resources, such as wood, leaves and fruits, are promising source of functional materials. The present study demonstrated presence of various natural products including terpenoids and polyphenols. Especially, polyphenols are shown to have many health benefits, such as antioxidative activity and inhibition of some digestive enzymes concerning to diabetes and hyperlipidemia. Furthermore, it is known that polyphenols and some terpenoids have antibacterial activities. Therefore, the results suggested the possibility of utilization of forest resources as the source of these functional natural compounds.