

雲南省産伝統薬物 *Rubia yunnanensis* および  
*Gentiana rigescens* の成分研究

2018 年

洲山 佳寛



## 目次

緒言	1
第1章 雲南省の伝統薬物について	3
第2章 アカネ科植物 <i>Rubia yunnanensis</i> 根の成分研究	5
第1節 序論	5
第2節 抽出・分離	
第3節 新規ナフトキノン誘導体 rubiaquinone A-E の構造解析	9
第1項 Rubiaquinone A (1)の構造解析について	9
第2項 Rubiaquinone B-E (2-5)の構造解析について	13
第4節 生物活性	25
第5節 小括	26
第3章 リンドウ科植物 <i>Gentiana rigescens</i> 地上部ならびに根および根茎の成分研究	29
第1節 序論	29
第2節 抽出・分離	30
第1項 地上部の抽出・分離	30
第2項 根および根茎の抽出・分離	34
第3節 新規化合物の構造解析	36
第1項 Rigenolide A (7)の構造解析	36
第2項 Rigenolide I (15)および J (16)の構造解析	40
第3項 Rigenolide B (8)および C (9)の構造解析	44
第4項 Rigenolide D (10)および E (11)の構造解析	50
第5項 Acylated secoiridoid の構造解析	53
第4節 生物活性	64
第5節 小括	65
結語	67
謝辞	69
実験の部	70
参考文献	79





## 緒言

コンビナトリアルケミストリーに基づく医薬品や抗体を中心とする生物学的製剤が数多く開発されている現在においても、天然資源に新たな医薬シードを求める研究が幅広く展開されている。近年では、ヒガンバナから単離されたアルカロイド *galanthamine* が認知症治療薬 {レミニール<sup>®</sup>, 2011 年上市(日本)} として、海洋生物クロイソカイメンから単離されたポリケチド *halichondrin B* をモチーフに合成された *eribulin* {ハラヴェン<sup>®</sup>, 2011 年上市(日本)} が抗悪性腫瘍薬として開発されているように、天然物は創薬において重要な役割を果たしている。

古人が経験的に見出し、伝統的に使用されてきた天然資源に関する情報が見直され、新たな医薬シードの発見、創薬に展開された例もある。2015 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した屠呦呦らが見出した *artemisinin* は、中国医学の古典における記述を参考にして発見され、抗マラリア薬として実用化された天然物である。

マラリアに効果のある天然物を探索していた屠呦呦らは、1700 年程前に書かれた中国医学の古典「肘后方」の治寒熱諸瘧方第十六の項に記載されている生薬「青蒿」が抗マラリア作用を示すことを期待して研究を開始した。生薬「青蒿」の基原植物には *Artemisia carvifolia* (和名：カワラニンジン) と *Artemisia annua* (和名：クソニンジン) が規定されているが、抗マラリア活性を示すのは *A. carvifolia* (漢名：青蒿) ではなく *A. annua* (漢名：黄花蒿) であることが明らかとなった。しかしながら、*A. annua* の抽出物は抗マラリア活性を示すものの、その再現性は乏しかった。そのため、「肘后方」に再度立ち戻り、その記載にある「青蒿一握 以水二升漬 絞取汁 盡服之 (一つかみの青蒿を 400 mL の水に浸し、しばらくとった汁を飲む)」という一文に注目し、それまで行っていた高温での抽出では活性成分が変化してしまうと考え、抽出方法を見直し、顕著な抗マラリア作用を示すジテルペン、*artemisinin* を見出した。

これら漢方薬・生薬・民間薬の源流とも言える中国の伝統薬に関する情報のいくつかは文書化されておらず、口伝により伝承されているものもあり、近代化や伝承者の減少により失われている現状がある。これらの情報の中には前述のように医薬シーズの発見につながる貴重な情報が多く含まれると考え、当研究室では中国、特に多くの少数民族が居住し、古くから独自の医療・薬物文化を伝承していると期待される雲南省において薬用資源調査を行い、6 年間で約 1000 種の伝統薬物に関する情報を得ている。

一方近年、ラセミ体医薬品を光学分割し、単一のキラル分子としたキラルスイッチ製剤が注目されている。これまでに、抗ヒスタミン薬 *cetirizine* (ジルテック<sup>®</sup>) の副作用 (眠気) を軽減した (+)-体のみの *levocetirizine* (ザイザル<sup>®</sup>)、プロトンポンプ阻害剤 *omeprazole* (オメプラール<sup>®</sup>) の代謝における CYP2C19 の寄与率を小さくし、遺伝子多型の影響を受けにくくした (-)-体のみの *esomeprazole* (ネキシウム<sup>®</sup>) などが新薬として承認されている。また、糖尿病治療薬 *pioglitazone* (アクトス<sup>®</sup>) は、(-)-体が体重増加や浮腫に関連する PPAR $\gamma$  アゴ

ニストであることに対し、(+)-体はミトコンドリアの機能調節や抗炎症作用を示すことが見  
出され、非アルコール性脂肪肝炎などに対する適応取得を目指して 2016 年に(+)-体の臨床  
第 1 相試験が開始された。このように、医薬品の有効成分の三次元構造の違いによる薬効あ  
るいは副作用への影響が改めて注目されており、天然資源を素材として新しい医薬シード  
を探索する際の絶対立体配置の帰属の重要性が高まっている。

上記の背景をふまえ、著者は中国雲南省の伝統薬物について含有成分の探索研究ならび  
に単離した天然物の絶対立体配置の帰属を含めた構造解析研究を行った。

## 第1章 雲南省の伝統薬物について

中国南西部に位置する雲南省は、6,000 m以上の高度差を有する複雑な地形により、亜熱帯から亜寒帯性気候の地域が存在する。そのため多数の森林類型がみられ、中国の省では最多の約17,000種の植物が自生している。また、雲南省には中国政府が認める56の民族の約半数にあたる25の民族が居住し、そのうち15民族は雲南省特有の少数民族である(Fig. 1)。彼らは、それぞれ隔離された居住区をもち、豊富な天然資源を利用した独自の民族薬物を伝承しており、これら民族伝統薬物から有用な医薬シーズが発見される可能性は高いと考えられる。しかし、彼らが保有する伝承医療・薬物に関する情報は近代化の波により消滅しつつあり、それらの情報を収集・整理し、記録に残すことは喫緊の課題である。

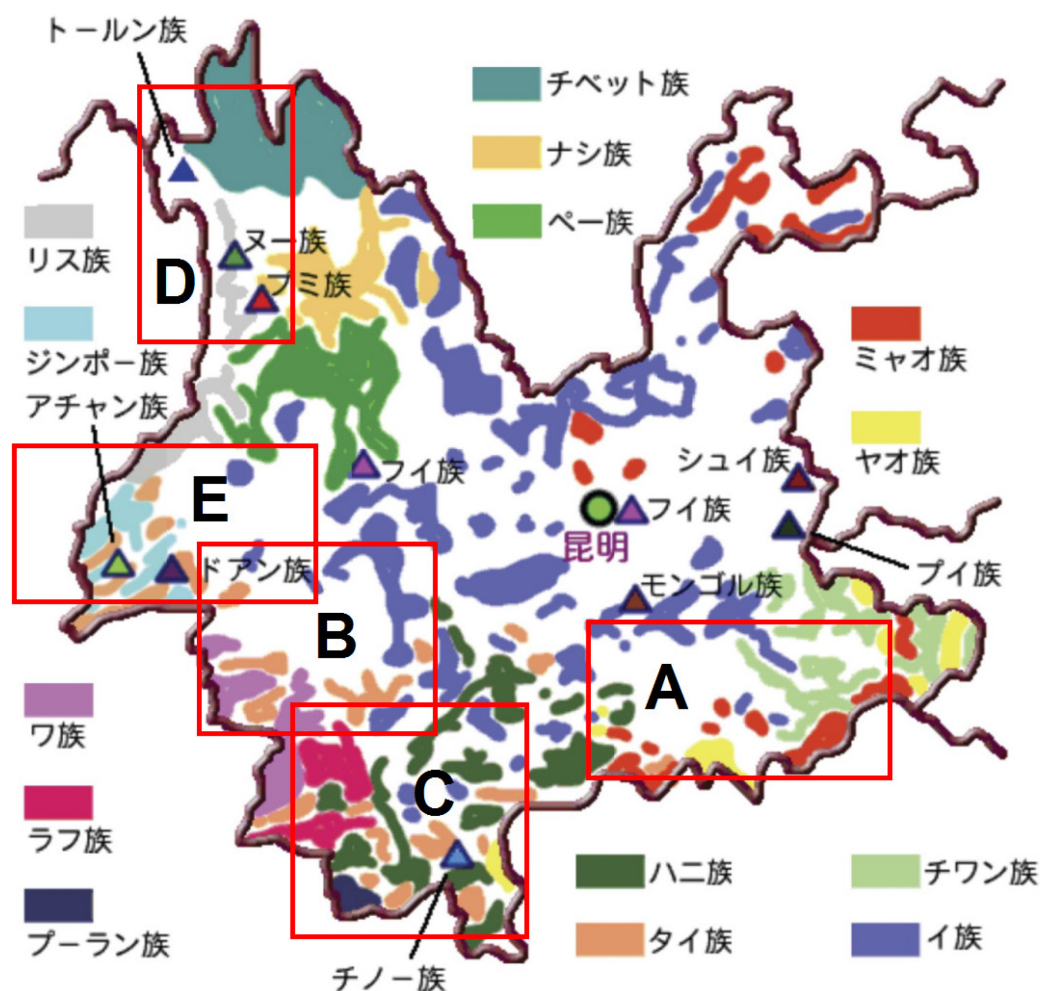


Figure 1. 雲南省の少数民族の居住区および調査範囲(A-E).

このような観点から、当研究室は、「中国雲南省少数民族の伝統薬物とその有効利用に関

する研究」を進め、2003年から2008年にかけて少数民族が伝承する天然薬物に関するフィールド調査を行っている。すなわち、2003年から2005年にかけて東南部、西部に居住するミャオ族、ラフ族、ハニ族、ワー族、タイ族、ヤオ族、ペー族、およびイ族について調査し、約520種の民族薬物の情報を得た (Fig.1 A, B 地域)。2006年から2008年にかけて南部、北西部、西部のミャオ族、ペー族、ハニ族、ヤオ族、リス族、ヌー族、トールン族、チンポー族、アチャン族、およびタイ族について調査し、約480種の民族薬物の情報を得た (Fig.1 C-E 地域)。その用途は多岐にわたっていたが、リウマチや外傷、婦人科領域での使用が特に多く見られた。

これら6年間に得られた植物材料のうち、著者は2008年に入手した、アカネ科植物 *Rubia yunnanensis* およびリンドウ科植物 *Gentiana rigescens* について成分研究を行った。

## 第2章 アカネ科植物 *Rubia yunnanensis* 根の成分研究

### 第1節 序論

#### 1) *Rubia* 属植物について

アカネ科 *Rubia* 属植物は約 70 種存在し、そのうち 36 種は中国に自生する [1]. 本属植物は最古の植物資源の一つで、*R. tinctorium* (セイヨウアカネ) は古くから世界中で赤色染料として使用されている. 例えば、ツタンカーメン王の墓で発見された赤色の織物からも、*Rubia* 属植物の主要色素成分 alizarin が検出されている [2]. 日本では奈良時代から *R. argyi* (=*R. akane*) (アカネ) を染料として用いている [3].

一方、中国医学三大古典のひとつで、生薬に関する知識を集積した薬物書である「神農本草経」の中品に *R. cordifolia* の根が「茜根」として収載されており、各種出血、血滞による疼痛などに効果があるとされている. 本生薬は現在も中国薬典に収載されており、心臓病、結核、リウマチ、吐血、鼻出血、および過食症などの治療に使用されている [4].

#### 2) *Rubia* 属植物の成分について

本属植物はアントラキノン類、ナフトキノン類、シクロペプチド類、およびトリテルペン類などを含有することが報告されている (Fig. 2.1) [4-9].

アントラキノン類は *Rubia* 属植物の主要成分であり、赤色色素の alizarin や中国薬典で茜草根の標準物質として規定されている purpurin などがある [10].

Mollugin を始めとするナフトキノン類も報告されているが [11], その単離報告数はアントラキノン類よりも少ない [4]. しかしながら、*Rubia* 属からは 15 種のナフトキノン二量体が単離されており、その特異な化学構造や生物活性から合成化学者にとっても魅力的なターゲットとなっている [12-20].

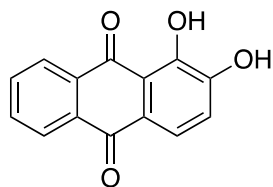
本植物から単離されたサイクロペプチド類は RAs や rubicordin A など抗がん活性を有することが示されている [6,21,22]. トリテルペン類では rubiarbonol A [23] など arborinane 型の骨格をものが多く単離されている [4,24-26].

#### 3) *Rubia yunnanensis* について

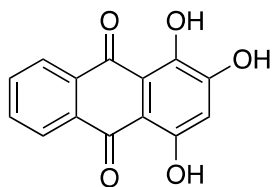
*Rubia yunnanensis* は中国本土の高山に自生する多年生植物である [27]. 中国では小茜草 (雲南茜草) と称し、その根が伝統薬として、貧血、打撲傷、リウマチ、慢性胃炎、脂肪瘤、月経不順などさまざまな疾患の治療に用いられてきた [28,29]. 本生薬は、1977 年版の中国薬典までは医薬品として収載されていたが、1985 年版より削除され、現在は同薬典に収載されている *R. coldifolia* (茜草根) の代用として使用されている. 当研究室では、2008 年の調査で雲南省の少数民族のイ族が本植物の根を鼻血や月経過多の治療に用いるという情報を得ている. 本植物の成分に関する報告はいくつか存在するが、キノン類の単離

報告は少ない [27,30-35]. 著者は, 薬用として用いられる *R. yunnanensis* の根の含有成分に着目し, 成分研究を行った.

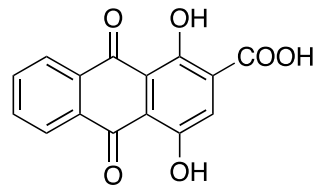
### anthraquinones



alizarin

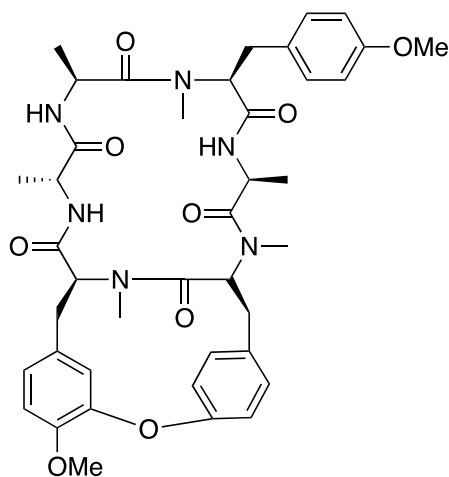


purpurin

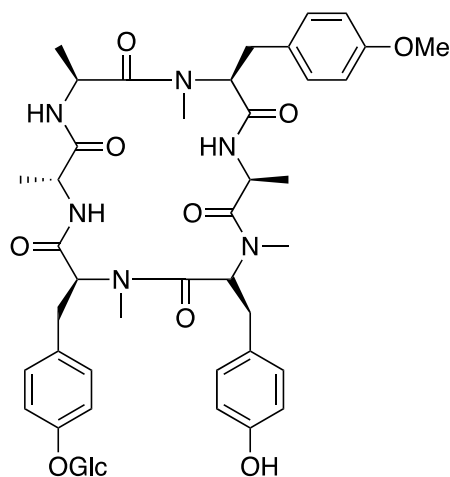


munjistin

### cyclopeptide

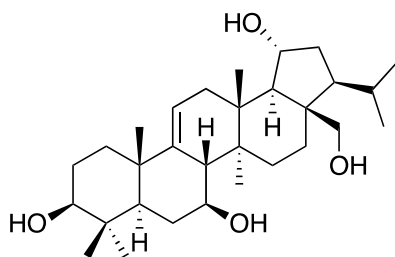


RA-VII

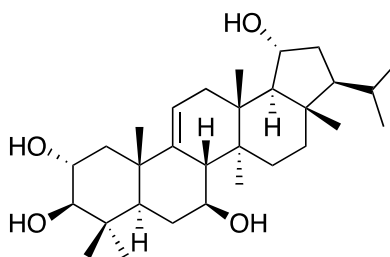


rubicordin A

### triterpenoids



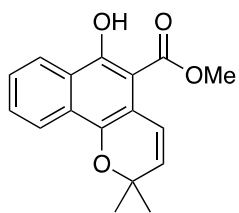
rubiarbonol A



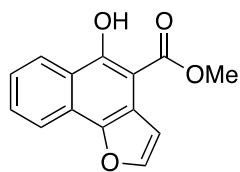
rubiarbonol E

**Figure 2.1.** Previously isolated compounds from *Rubia* plants.

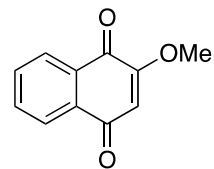
naphthoquinones



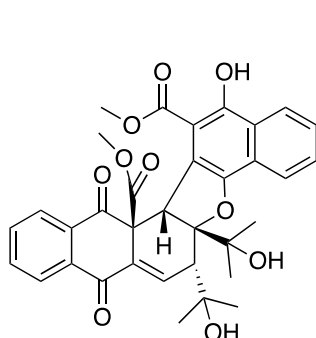
mollugin



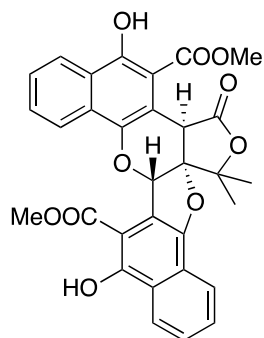
furomollugin



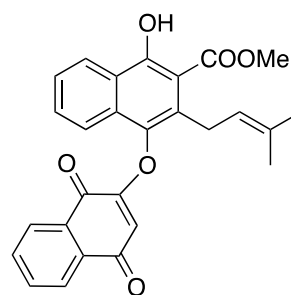
2-methoxy-1,4-naphthoquinone



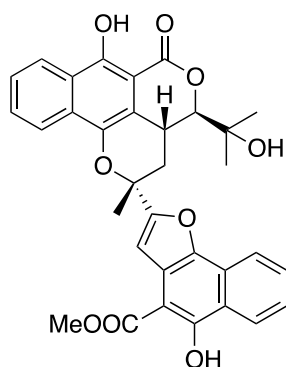
rubioncolin A



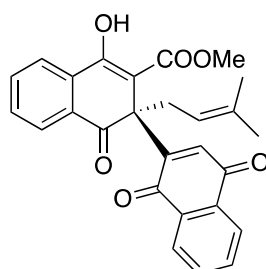
rubioncolin B



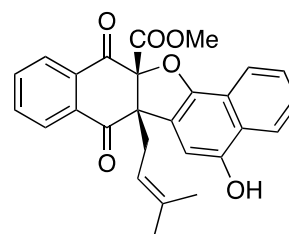
rubioncolin C



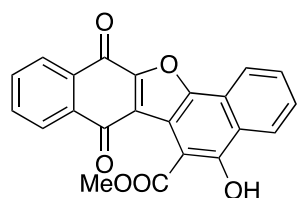
rubicordifolin



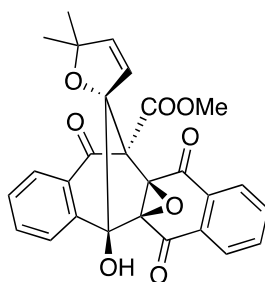
rubipodanone A



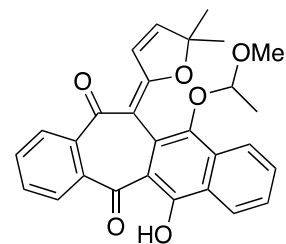
rubipodanone B



methyl 5-hydroxy-dinaphtho[1,2-2',3']furan-7,12-dione-6-carboxylate



rubialatin A

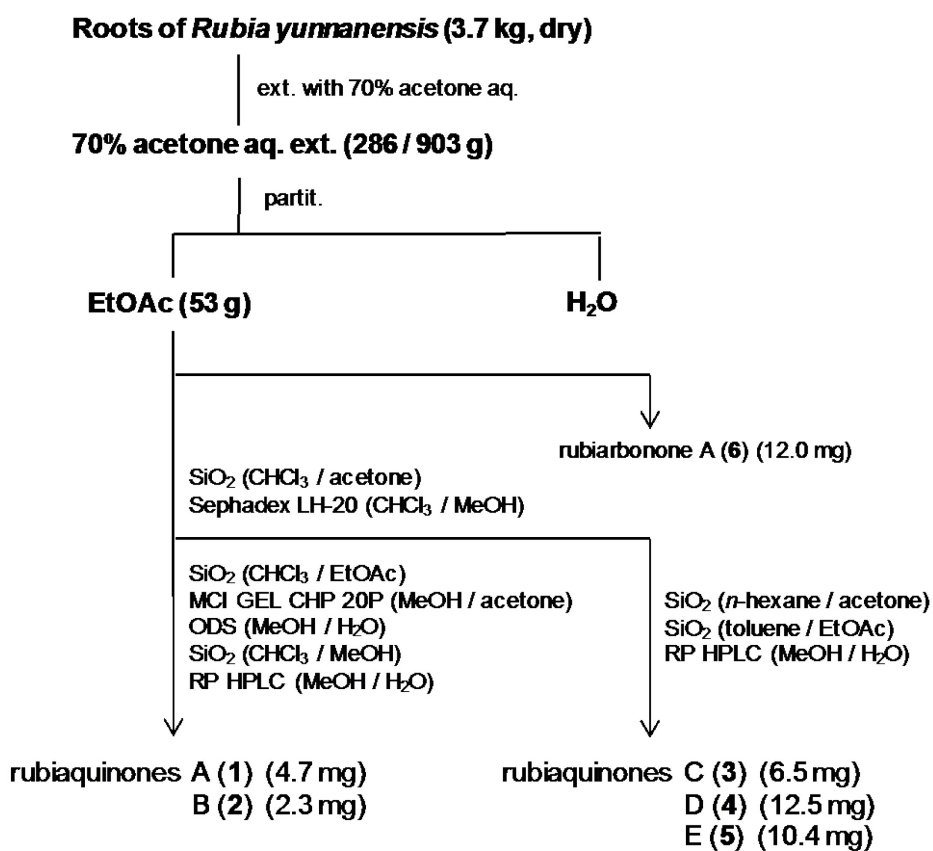


rubialatin B

Figure 2.1. Previously isolated compounds from *Rubia* plants.

## 第2節 抽出・分離

2008年に雲南省にて購入した *R. yunnanensis* の根 (3.7 kg) を 70% acetone aq. で冷浸抽出し、得られたエキスを EtOAc と H<sub>2</sub>O で分配した。得られた EtOAc 可溶画分を SiO<sub>2</sub> カラムを用いて粗分画したのち、Sephadex LH-20 カラムによりトリテルペン含有画分とキノン含有画分に分離した。キノン含有画分を SiO<sub>2</sub> カラム, MCI GEL CHP 20P カラム, ODS カラム等を用いて繰り返し分離し、5 種の新規ナフトキノン誘導体 rubiaquinone A–E (1–5) を単離した (Scheme 2.1)。新規化合物単離の過程で既知化合物の rubiarbonone A (6) [30] を単離・同定した。



Scheme 2.1. Isolation scheme of rubiaquinones A–E (1–5) from *R. yunnanensis* roots.

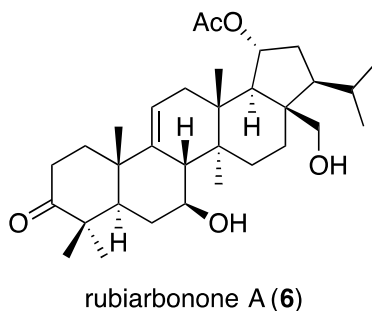


Figure 2.2. Structure of a known triterpene, rubiarbonone A (6).



### 第3節 新規ナフトキノン誘導体 rubiaquinone A-E (1-5)の構造解析

#### 第1項 Rubiaquinone A (1)の構造解析について

Rubiaquinone A (1)は黄色非晶性固体として得られ, 高分解能 ESIMS より分子式を  $C_{23}H_{16}O_5$  と帰属した  $\{m/z\ 395.0899\ [M+Na]^+$ , calcd for  $C_{23}H_{16}O_5Na$ , 395.0895}. IR スペクトルよりヒドロキシ基 ( $3416\ cm^{-1}$ )およびカルボニル基 ( $1707$  and  $1670\ cm^{-1}$ )の存在を推定した.  $^1H$  および  $^{13}C$  NMR スペクトルからは, 1個の五置換ベンゼン, 2個の1,2-二置換ベンゼン, 1個の $\alpha,\beta$ -不飽和ケトン, 1個のアセトニル基の存在が示唆された(Fig. 2.3 and Table 2.1).

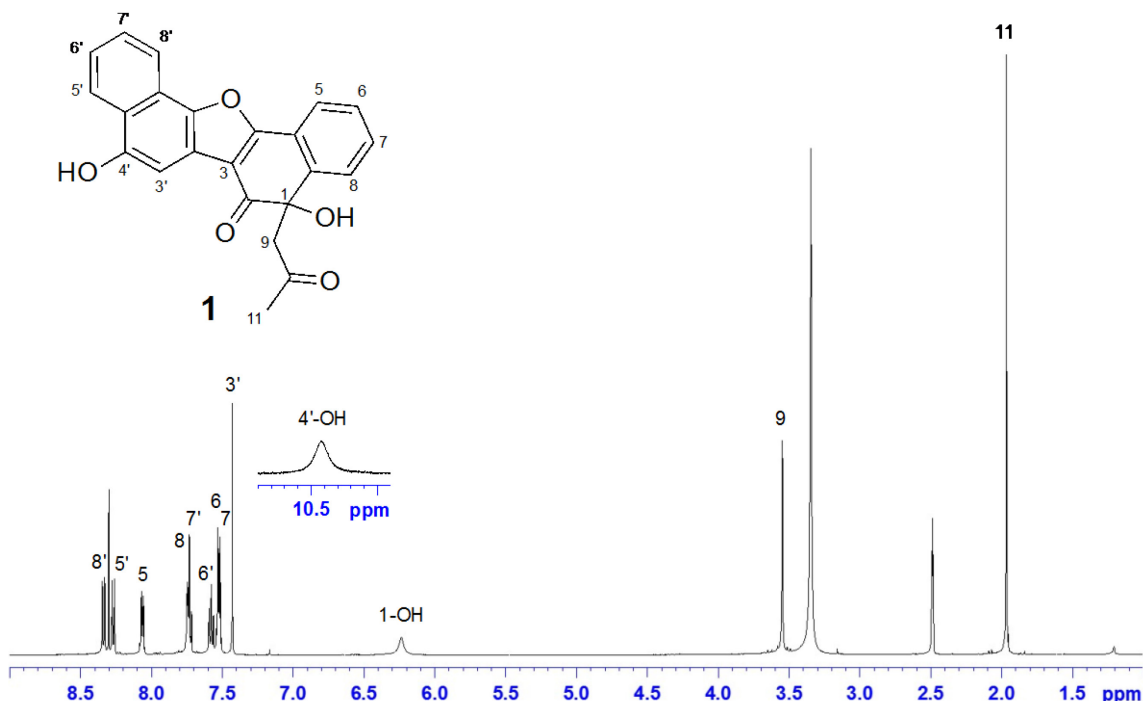
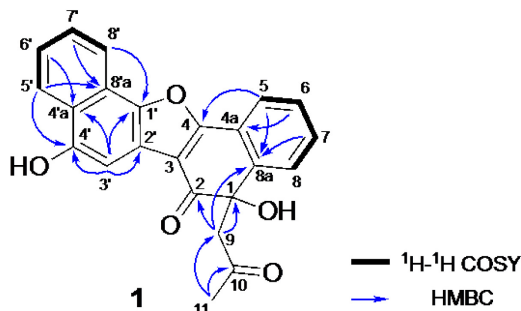


Figure 2.3.  $^1H$  NMR spectrum of rubiaquinone A (1) in  $DMSO-d_6$  (500 MHz).

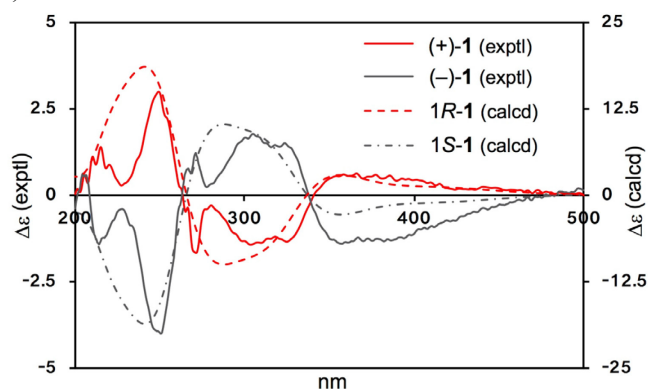
$^1H$ - $^1H$  COSY および HMBC スペクトルの解析から, 1の平面構造を明らかにした. H-5'-H-6'-H-7'-H-8'間の COSY 相関, および H-5'と C-4'および C-8'a 間, H-8'と C-1' 間, H-3'と C-1', C-2', C-4', および C-4'a 間の HMBC 相関から 1,4-dihydroxynaphthalene 部分 (C-1'-C-8'a)の構造を明らかにした. さらに H-5-H-6-H-7-H-8 間の COSY 相関, H-5 と C-4 および C-8a 間, H-7 と C-8a 間, H-9 と C-1, C-2, および C-8a 間, H<sub>3</sub>-11 と C-9 および C-10 間の HMBC 相関から 4-hydroxy-1,2-naphthoquinone 部分 (C-1-C-8a)の構造と, C-1 に結合するアセトニル基の存在を推定した. また, 不飽和度と  $^{13}C$  のケミカルシフト値[C-1' ( $\delta_c$  144.3), C-2' ( $\delta_c$  120.3), C-3 ( $\delta_c$  113.4), C-4 ( $\delta_c$  161.4)]を考慮し, 1,4-dihydroxynaphthalene と 4-hydroxy-1,2-naphthoquinone がフラン環を形成して結合すると結論した. 以上の結果から, rubiaquinone A

(1)の平面構造を Fig. 2.4 に示す構造と帰属した.



**Figure 2.4.** Selected 2D NMR correlations for rubiaquinone A (**1**).

Rubiaquinone A (**1**)は旋光性を示さなかった事からラセミ体であると考え、キラルカラムを用いた光学分割を行った。その結果、一組のエナンチオマー(+)-**1** と(-)-**1** を約 1:1 の比で得た。旋光度の正負は JASCO OR-2090Plus chiral detector を用いて確認した[後述の rubiaquinone B-E (**2-5**)も同様]。ECD スペクトルの実測値を計算化学的手法を用いて算出したスペクトルと比較した。その結果、(+)-**1** と(-)-**1** の実測値がそれぞれ 1-*R* と 1-*S* の計算値と良く対応したため、(+)-**1** と(-)-**1** の C-1 の絶対立体配置をそれぞれ *R* および *S* と推定した。



**Figure 2.5.** Experimental and calculated ECD spectra for enantiomers [(+)-**1** and (-)-**1**] of rubiaquinone A (**1**) (calculated spectra were blue-shifted by 20 nm).

(補足) 天然有機低分子化合物の絶対立体配置の帰属には主に以下に示した手法が用いられる。

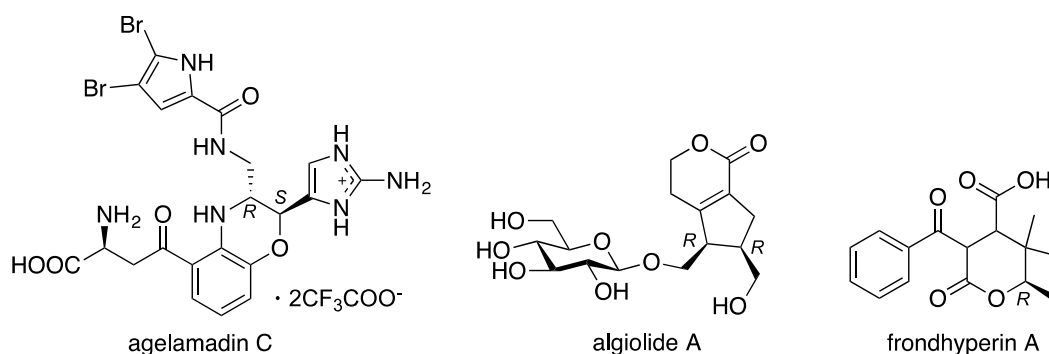
① 全合成：予測される立体異性体を全て合成し、それらのスペクトルデータを比較して立体配置を帰属する方法である。最も確実な絶対配置決定方だが、デメリットとして多大な時間とコストがかかる。

② X線結晶構造解析：古くから用いられる帰属方法である。しかしながら、解析には純度の高い単結晶の調製が必要であり、最も確実な絶対配置決定法だが、微量天然物では単結晶の作成がより困難である。近年、藤田らにより細孔性錯体結晶に分析対象となる化合物を導入し構造決定を行う、結晶スポンジ法 [36]が開発され注目されているが、未だ適応可能な分子は限定的である。

③ キラル試薬を用いた手法 (改良 Mosher 法 [37], PGME 法 [38,39]等) : 天然物にキラル試薬を縮合させて得られるジアステレオマー間の NMR 化学シフト値の差から絶対立体配置を帰属する方法. 一般的に普及している NMR を用いた帰属が可能だが, 誘導化のため化合物を消費してしまうという欠点がある. また, 構造中に二級水酸基やキラルなカルボン酸の存在が必要であり, 適応可能な化合物に制限がある.

④ CD スペクトル: 紫外・可視光を利用する ECD スペクトルと赤外光を利用する VCD スペクトルがあり, サンプルを消費することなく測定が可能である. ECD スペクトルでは紫外・可視領域に吸収帯を有する発色団の存在が必要であるが,  $\mu\text{g}$  スケールの少量のサンプルでの測定が可能である. VCD スペクトルでは発色団は必要なく, ほとんどすべての光学活性な有機分子に適応できる. しかしながら, VCD では数 mg 程度のサンプルが必要となる.

ECD スペクトルを用いた絶対立体配置の解明には, オクタント則[40,41]などの経験則あるいは励起子キラリティー法 [42]などの非経験則が用いられてきた. 一方で近年, 計算機の劇的な性能向上に伴い量子力学計算を用いた ECD スペクトルの予測が机上のコンピューターでも可能となり, ECD スペクトルの実測値を量子計算で得た ECD スペクトルと比較することで, 非経験的に化合物の絶対立体配置が推定できるようになった. 天然物の構造解析にもこの手法の有用性が認知され, 広く応用されている [43]. 当研究室でも ECD スペクトルの量子力学計算を用い, 現在までに agelamadin C-E [44], algiolide A [45], ならびに frondhyperin A-D [46]といった天然物の絶対立体配置を明らかにしてきた (Fig. S1). しかしながら, 鎖状化合物や大環状ラクトンなどのフレキシブルな構造を有する化合物については, 高精度の計算を行うことは難しいと考えられる.



**Figure S1.** Structures of agelamadin C, algiolide A, and frondhyperin A.

ECD スペクトルの計算は以下の手順で行われる. はじめに, 1) 分子力学法や半経験的分子軌道法などの計算コストの低い計算法を用いて, 配座探索を行い安定配座を選出する. 2) 得られた安定配座を計算コストの高い密度汎関数 (DFT) 法などを用いて最適化する. 続いて, 3) 時間依存密度汎関数 (TDDFT) 法により, 最適化された配座の旋光強度を算出する. 4) 旋光強度をガウス分布で表すことで, ECD スペクトルの計算値が得られる. 一連の過程で, 計算時間の短縮や精度の向上を目的に, Boltzmann 分布に基づく安定配座の絞り込みや

スペクトルの加重平均化が行われる [43].

Rubiaquinone A (**1**)は分子内に不飽和ケトンやベンゼン環といった発色団を有しており、立体配置の解析に ECD スペクトルを用いることができる。また、構造もリジットであるため量子力学計算を用いた ECD スペクトルの比較による解析に適した化合物である。

---

## 第2項 Rubiaquinone B-E (2-5) の構造解析について

Rubiaquinone B (2)は赤色非晶性固体として得られ、分子式は高分解能ESIMSから $C_{33}H_{20}O_8$ であることが示された  $\{m/z\ 567.1070\ [M+Na]^+$ , calcd for  $C_{33}H_{20}O_8Na$ , 567.1056}.  $^1H$  NMR スペクトルでは、3個の交換性プロトン、12個の芳香族プロトン、およびアセトニル基に帰属されるシグナルが観測された (Fig. 2.5). 2の $^{13}C$  NMRでは、1とよく対応したシグナル (C-1-C-11 and C-1'-C-8'a)に加え、2-hydroxy-1,4-naphthoquinone部分 (C-1''-C-8''a)に基づく10個の炭素シグナルが観察された (Table 2.1).  $^1H$ - $^1H$  COSY および HMBC スペクトルの詳細な解析からも、2-hydroxy-1,4-naphthoquinone部分 (C-1''-C-8''a)の存在が支持された (Fig. 2.6). さらに、2の分子式と1で観測されたH-3'に帰属されるシグナルが消失していたことを考慮し、rubiaquinone Bはrubiaquinone A (1)のC-3'に2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (C-1''-C-8''a)が結合した、三量体構造を有する化合物と帰属した.

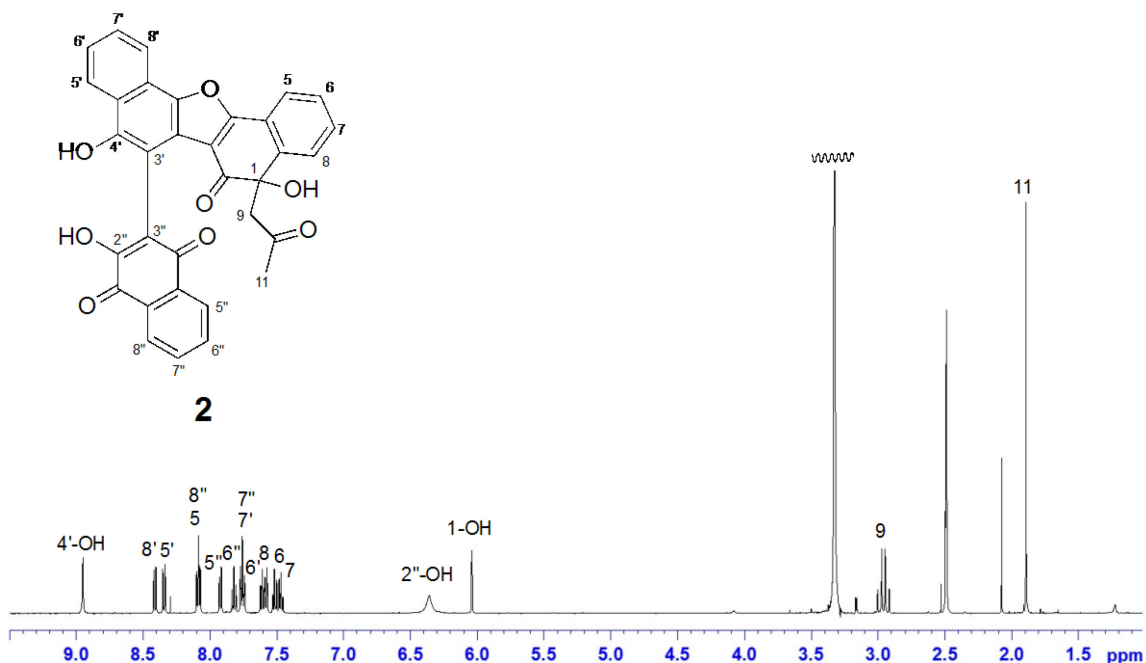
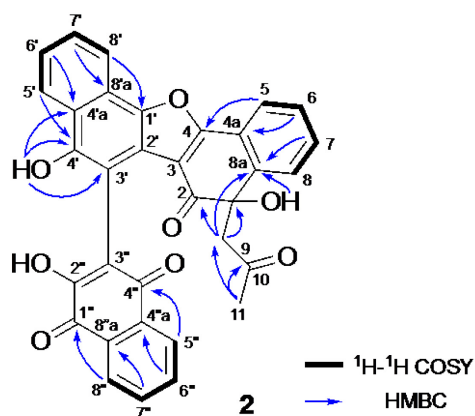


Figure 2.6.  $^1H$  NMR spectrum of rubiaquinone B (2) in  $DMSO-d_6$  (500 MHz).



**Figure 2.7.** Selected 2D NMR correlations for rubiaquinone B (**2**).

Rubiaquinone C (**3**)は **2** と同一の分子式  $C_{33}H_{20}O_8$  を有し  $\{m/z\ 567.1070 [M+Na]^+$  (calcd for  $C_{33}H_{20}O_8Na, 567.1056\}$ ),  $^1H$  および  $^{13}C$  NMR スペクトルは **2** のそれらとよく類似したスペクトルを示した (Table 2.1).  $^1H$ - $^1H$  COSY および HMBC スペクトルにおいて **2** と同様の相関が得られたことから, **3** の平面構造を **2** と同一の構造と帰属した. しかし,  $H_2-9$  のケミカルシフトにわずかな違いが見られたため, **3** を **2** の立体異性体と推定した.

**Table 2.1.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for rubiaquinones A–C (1–3) in DMSO-*d*<sub>6</sub>

position	1		2		3	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H ( <i>J</i> in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H ( <i>J</i> in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H ( <i>J</i> in Hz)
1	74.4	–	77.2	–	77.2	–
2	194.5	–	194.2	–	194.1	–
3	113.4	–	114.5	–	114.5	–
4	161.4	–	161.1	–	161.0	–
4a	123.5	–	123.2	–	123.0	–
5	122.1	8.06 (1H, dd, 5.7, 3.3)	122.2	8.09 (1H, brd, 7.5)	122.2	8.09 (1H, d, 7.5)
6	128.4	7.53 (1H, td, 5.7, 3.3)	128.4	7.52 (1H, td, 7.5, 1.2)	128.4	7.51 (1H, t, 7.5)
7	130.5	7.52 (1H, td, 5.7, 3.3)	130.1	7.47 (1H, td, 7.5, 1.2)	130.2	7.46 (1H, t, 7.5)
8	127.9	7.74 (1H, m)	127.5	7.58 (1H, brd, 7.5)	127.4	7.57 (1H, d, 7.5)
8a	144.1	–	143.2	–	143.2	–
9	54.7	3.56 (1H, d, 17.3) 3.52 (1H, d, 17.3)	54.7	2.99 (1H, d, 14.8) 2.93 (1H, d, 14.8)	55.1	3.05 (1H, d, 14.8) 3.00 (1H, d, 14.8)
10	206.1	–	205.0	–	205.3	–
11	30.5	1.96 (3H, s)	31.4	1.89 (3H, s)	31.5	1.91 (3H, s)
1-OH		6.23 (1H, brs)		6.04 (1H, s)		6.10 (1H, s)
1'	144.3	–	144.8	–	144.9	–
2'	120.3	–	121.8	–	121.5	–
3'	99.5	7.42 (1H, s)	107.2	–	107.0	–
4'	151.7	–	148.4	–	148.7	–
4'a	123.7	–	124.4	–	124.4	–
5'	123.7	8.26 (1H, brd, 8.2)	124.0	8.35 (1H, d, 8.0)	124.0	8.33 (1H, d, 8.0)
6'	125.3	7.58 (1H, td, 8.2, 1.2)	125.4	7.61 (1H, t, 8.0)	125.4	7.60 (1H, t, 8.0)
7'	128.0	7.73 (1H, m)	127.6	7.76 (1H, m)	127.6	7.75 (1H, m)
8'	119.6	8.34 (1H, brd, 8.2)	119.7	8.41 (1H, d, 8.0)	119.7	8.41 (1H, d, 8.0)
8'a	121.0	–	120.8	–	120.8	–
4'-OH		10.44 (1H, brs)		8.95 (1H, s)		8.97 (1H, s)
1''			182.6	–	182.5	–
2''			147.0	–	147.5	–
3''			110.5	–	110.4	–
4''			181.0	–	181.0	–
4''a			134.4	–	134.6	–
5''			125.8	7.92 (1H, d, 7.4)	125.9	7.97 (1H, d, 7.3)
6''			134.4	7.82 (1H, td, 7.4, 1.2)	134.4	7.83 (1H, t, 7.3)
7''			131.9	7.76 (1H, m)	131.9	7.77 (1H, m)
8''			125.5	8.08 (1H, d, 7.4)	125.6	8.07 (1H, d, 7.3)
8''a			131.1	–	131.2	–
2''-OH				6.36 (1H, s)		6.32 (1H, s)

Rubiaquinone B (**2**)は旋光性を示さなかったことから、ラセミ体であると推定した。**2**についてキラルカラムを用いて光学分割を行い、(+)-**2** および(-)-**2** を約 1:1 の比で得た。一方、Rubiaquinone C (**3**)についても同様にキラルカラムを用いて光学分割を行い、(+)-**3** および(-)-**3** を得た。

以上の結果から、rubiaquinone B (**2**) および C (**3**)は、C-1 キラル炭素と C-3'/C-3''間の不斉軸における立体異性体の混合物であることが分かった。すなわち、(±)-**2** および(±)-**3** は、(M,1S)/(P,1R)あるいは (M,1R)/(P,1S)の組み合わせのラセミ体である(Fig. 2.8)。

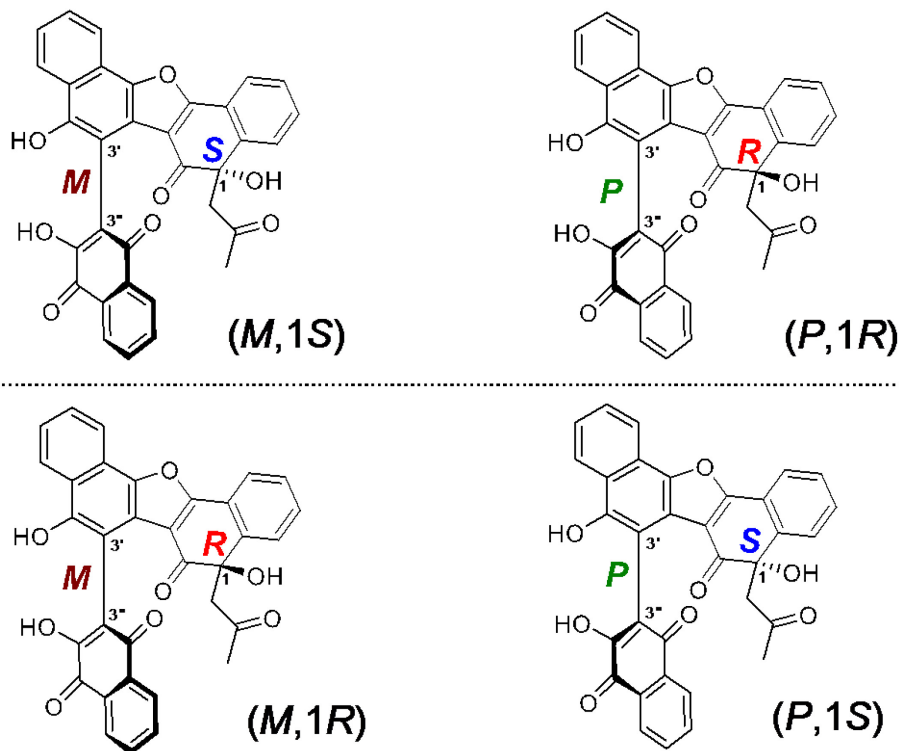
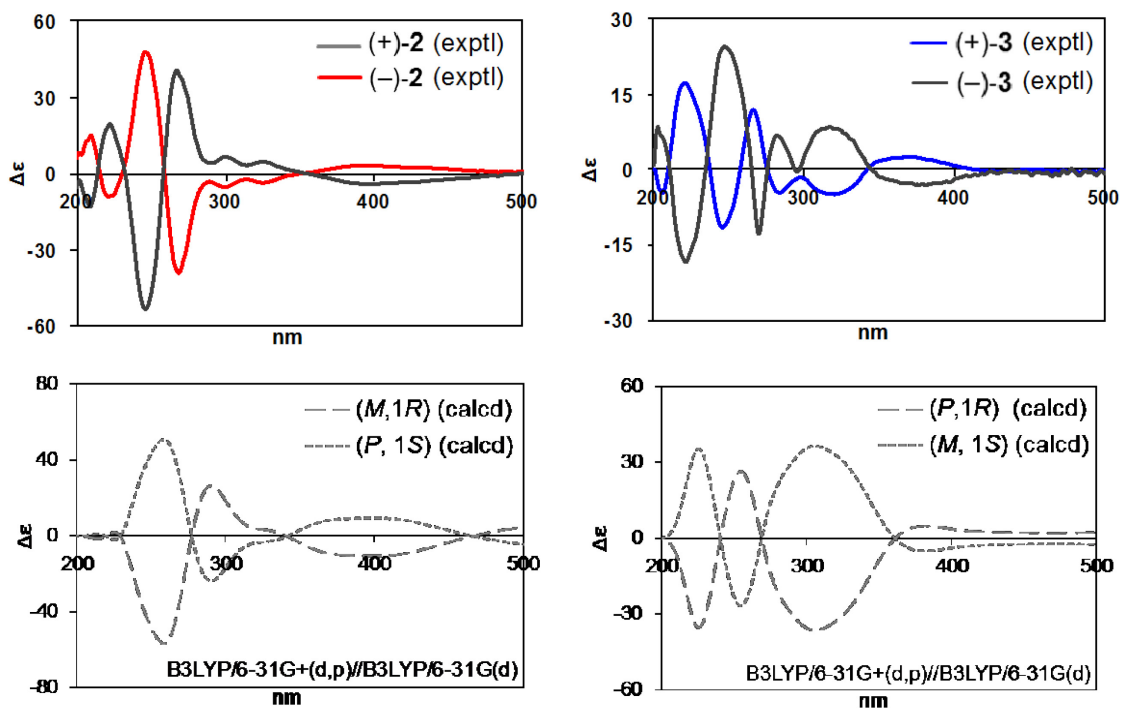


Figure 2.8. Possible stereoisomers of rubiaquinones B (**2**) and C (**3**).

光学分割により得た (+)-**2**, (-)-**2**, (+)-**3**, および(-)-**3** の絶対立体配置の帰属を行うため、ECD スペクトルの実測値と計算値の比較による帰属を試みた。まず、rubiaquinone B (**2**)および C (**3**)のとり得る 4 種の立体異性体{(M,1S), (P,1R), (M,1R), および(P,1S)}の ECD スペクトルを計算化学的手法を用いて算出した。(+)-**2**, (-)-**2**, (+)-**3**, および(-)-**3** の ECD スペクトルの実測値を(M,1S), (P,1R), (M,1R), および(P,1S)の ECD スペクトルの計算値と比較した。しかしながら、これらの実測値と計算値は共に非常に複雑な Cotton 効果を示したため、比較による帰属は困難であった (Fig. 2.9)。そこで、ECD スペクトルの加算による検討を行った。





**Figure 2.9.** Experimental (solid line) and calculated (dotted line) ECD spectra for stereoisomers of rubiaquinones B (2) and C (3).

(補足) ECD の加算スペクトルのコンセプトについて説明する. Rubiaquinone B (2) および C (3) の推定される 4 種の立体異性体  $\{(M,1S), (P,1R), (M,1R), \text{および}(P,1S)\}$  の ECD スペクトルを  $(M,1R)$  と  $(P,1R)$ , あるいは  $(P,1S)$  と  $(M,1S)$  となる組み合わせで足し合わせると不斉軸に由来する Cotton 効果が相殺され, 不斉炭素に由来する Cotton 効果のみが抽出された ECD 加算スペクトルが得られると考えた (Fig. S2).

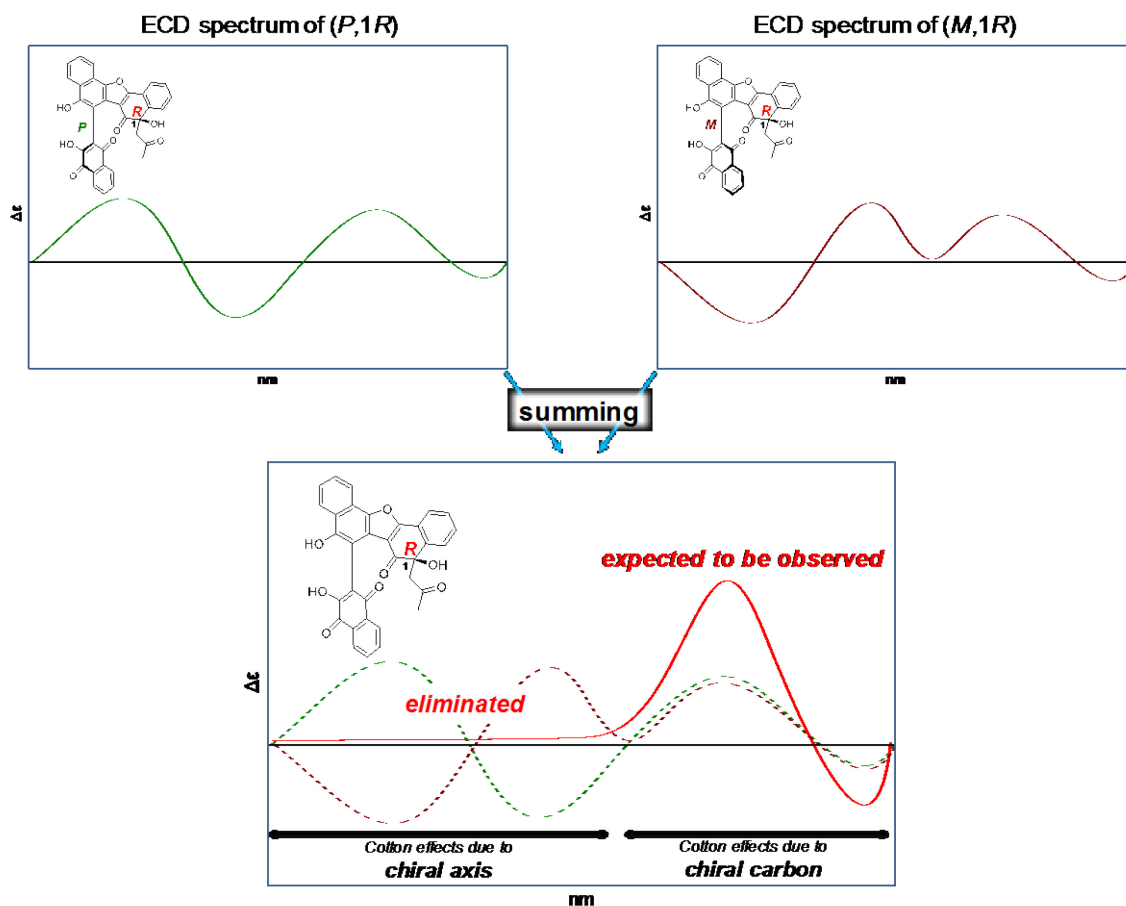
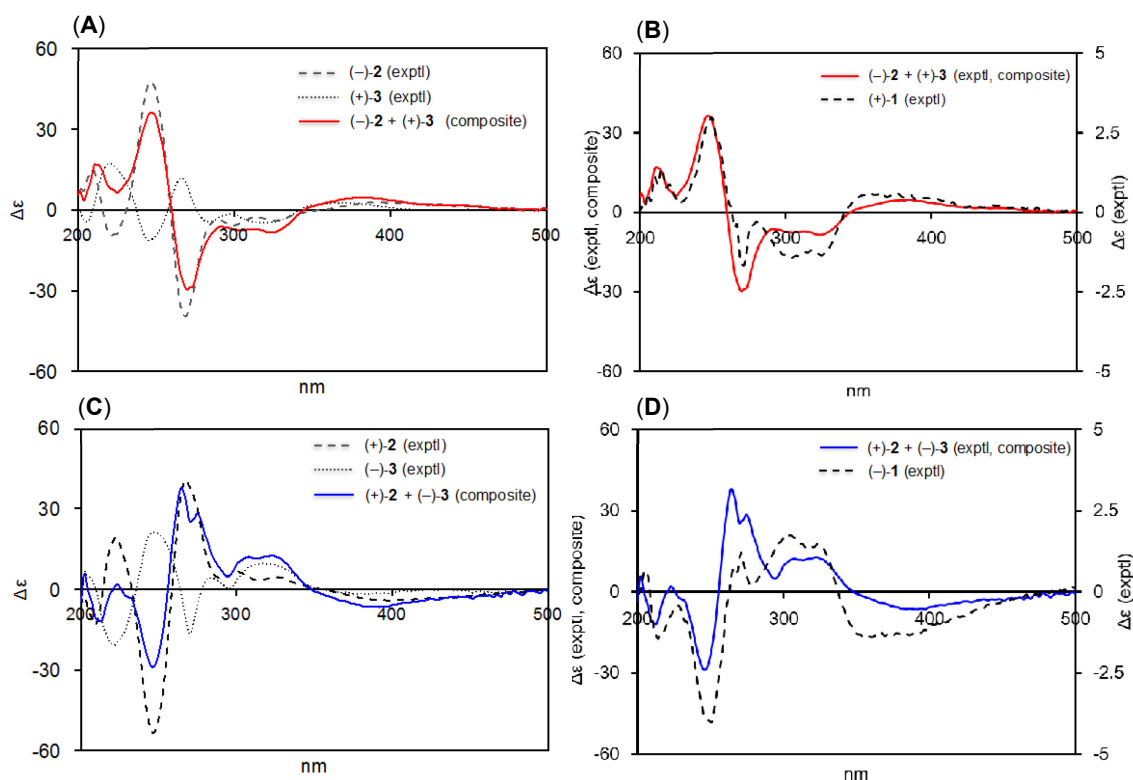


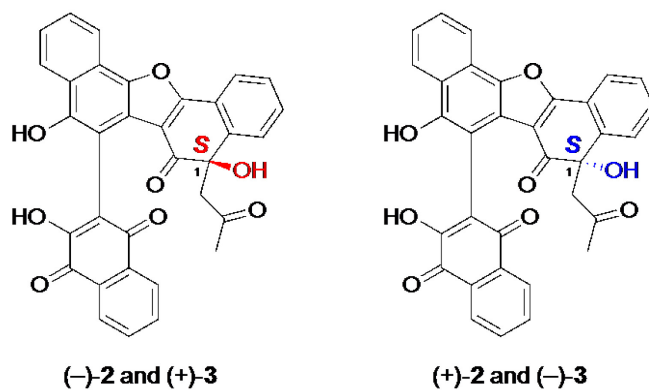
Figure S2. Concept of composite ECD spectrum.

まず,  $(-)$ -2 と  $(+)$ -3 の ECD スペクトルの実測値を足し合わせそれらの加算スペクトルを得た (Fig. 2.10.A). この加算スペクトルは  $(+)$ -rubiaquinone A (1) の実測値とよく対応していた (Fig. 2.10.B). すなわち,  $(-)$ -2 と  $(+)$ -3 の ECD スペクトルの加算により, 不斉軸に由来する Cotton 効果が打ち消され,  $R$  配置の不斉炭素に由来する Cotton 効果のみが反映された, 期待通りの加算スペクトルが得られたと判断した. 以上の結果から,  $(-)$ -2 と  $(+)$ -3 はいずれも  $(+)$ -rubiaquinone A (1) と同じ  $1R$  配置を有すると推定した.

一方, (+)-**2** と(-)-**3** の ECD スペクトルの実測値から得た加算スペクトル(Fig. 2.10.C)は(-)-rubiaquinone A の実測値とよく対応していたことから(Fig. 2.10.D), (+)-**2** と(-)-**3** は (-)-rubiaquinone A と同じ 1*S* 配置と帰属した。



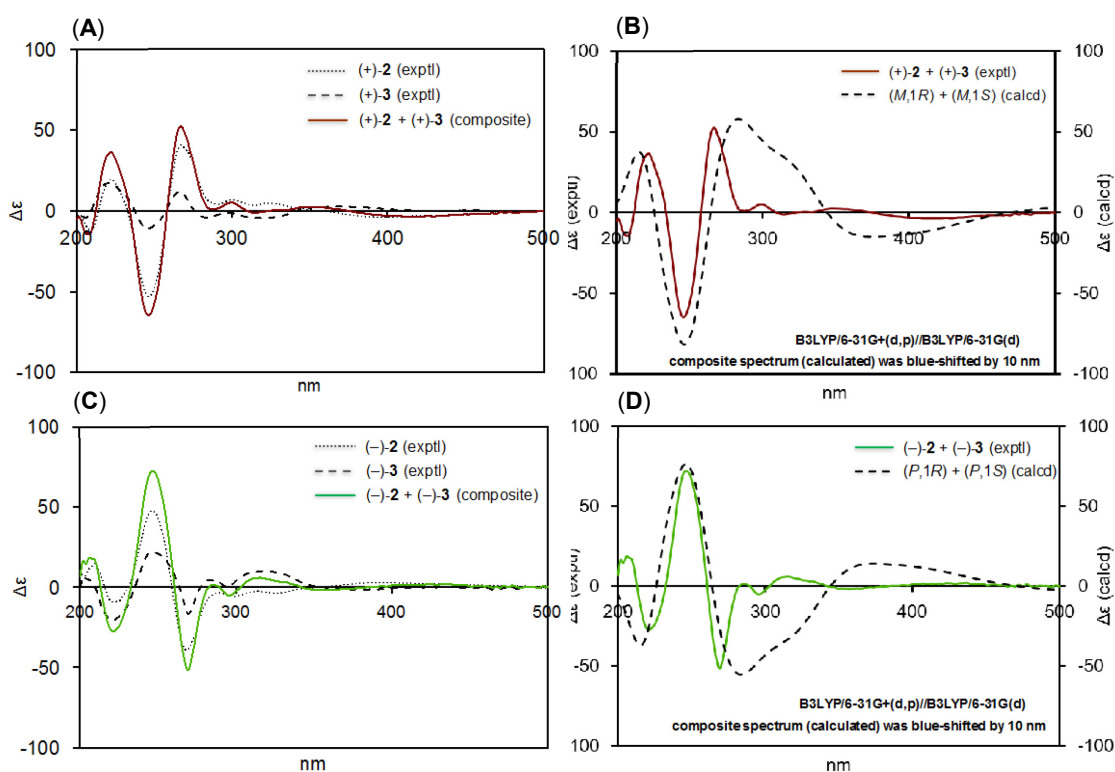
**Figure 2.10.** (A) Composite ECD spectrum generated by summing experimental ECD spectra of (-)-**2** and (+)-**3**. (B) Comparison of composite ECD spectrum with ECD spectrum of (+)-**1** (experimental). (C) Composite ECD spectrum generated by summing experimental ECD spectra of (+)-**2** and (-)-**3**. (D) Comparison of composite ECD spectrum with ECD spectrum of (-)-**1** (experimental).



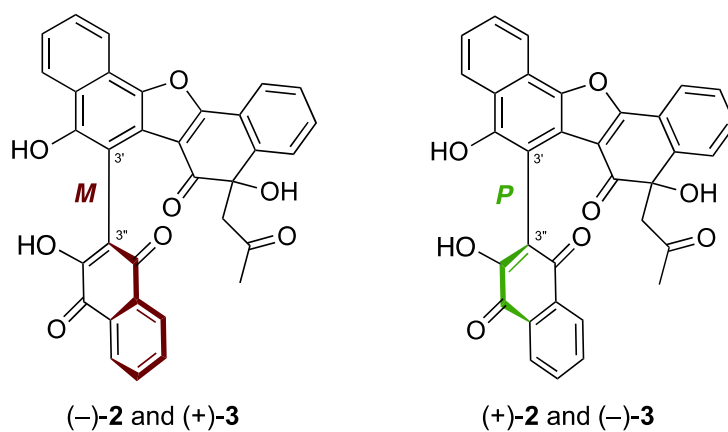
**Figure 2.11.** Absolute stereochemistry at C-1 for rubiaquinones B (**2**) and C (**3**).

前述の検討により帰属された C-1 の絶対配置が逆の組み合わせになる (+)-2 と (+)-3 および (-)-2 と (-)-3 の組合せで ECD スペクトルを足し合わせて得た加算スペクトルでは C-1 の立体配置に基づく Cotton 効果が相殺され、C-3'/C-3" の不斉軸に由来する Cotton 効果のみを示すと考えた。これら実測値の加算スペクトルを (M,1S) と (M,1R) あるいは (P,1S) と (P,1R) の計算値から得た加算スペクトルと比較することで、軸性キラリティーの帰属を試みた。(+) -2 と (+)-3 から得た ECD 加算スペクトルが (M,1S) と (M,1R) の計算値から得た加算スペクトルとよく対応していたことから、(+)-2 と (+)-3 の軸性キラリティーを M と推定した。

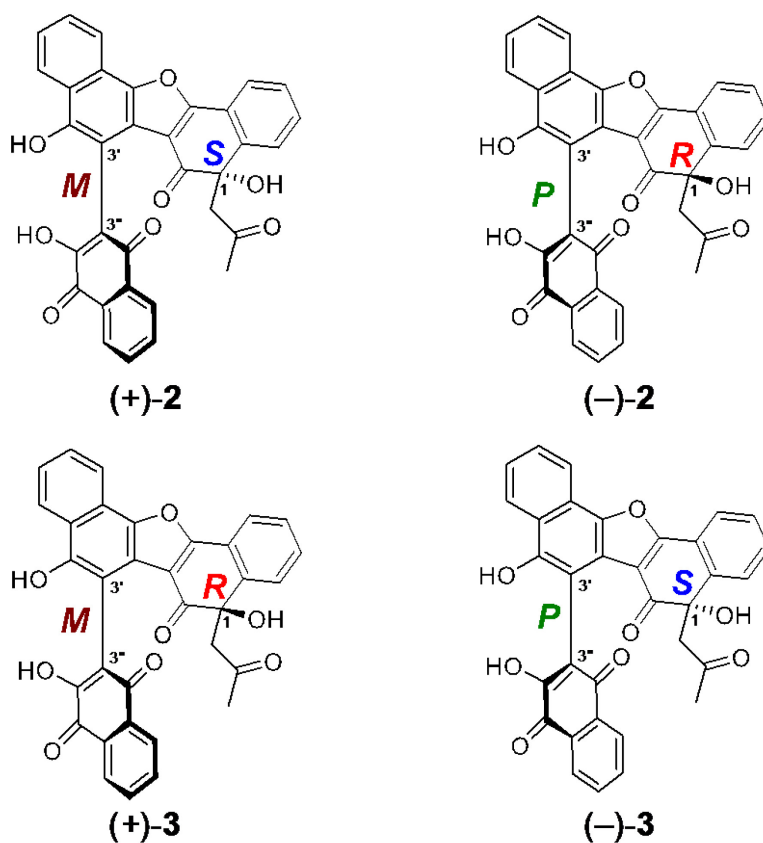
同様の検討から (-)-2 と (-)-3 は P 配置であると結論した。以上の結果から、(+)-2, (-)-2, (+)-3 および (-)-3 の絶対立体配置をそれぞれ (M,1S), (P,1R), (M,1R) および (P,1S) と帰属した。



**Figure 2.12.** (A) Composite ECD spectrum generated by summing experimental ECD spectra of (+)-2 and (+)-3. (B) Comparison of composite ECD spectra (experimental and calculated). (C) Composite ECD spectrum generated by summing experimental ECD spectra of (-)-2 and (-)-3. (D) Comparison of composite ECD spectra (experimental and calculated).



**Figure 2.13.** The helicities of the C-3'/C-3'' chiral axis for rubiaquinones B (2) and C (3).



**Figure 2.14.** Stereochemistries for enantiomers of rubiaquinones B (2) and C (3)

Rubiaquinone D (**4**)および E (**5**)は、HRESIMS から同一の分子式  $C_{36}H_{24}O_8$  を有することが明らかとなった { $m/z$  607.1349  $[M+Na]^+$  for **4**,  $m/z$  607.1360  $[M+Na]^+$  for **5**, (calcd for  $C_{36}H_{24}O_8Na$ , 607.1369)}.  $^1H$  および  $^{13}C$  NMR は rubiaquinone B (**2**) および C (**3**) のそれらとよく対応していたが、**4** および **5** では 2 個のアセトニル基に由来するシグナルが観測された。  $^1H$ - $^1H$  COSY および HMBC スペクトの解析から、rubiaquinone B (**2**) および C (**3**) と同様の 1,4-dihydroxynaphthalene 部分 (C-1'-C-8'a) および 4-hydroxy-1,2-naphthoquinone 部分 (C-1-C-8a) を有することが明らかとなった。新たに観察されたアセトニル基の結合位置は H-9" と C-1", C-2", および C-3" 間の HMBC 相関から C-2" と帰属し、Rubiaquinone D (**4**) および E (**5**) の平面構造を rubiaquinone B (**2**) および C (**3**) の 2" 位に結合するヒドロキシ基に代わり、アセトニル基をもつ構造と帰属した。

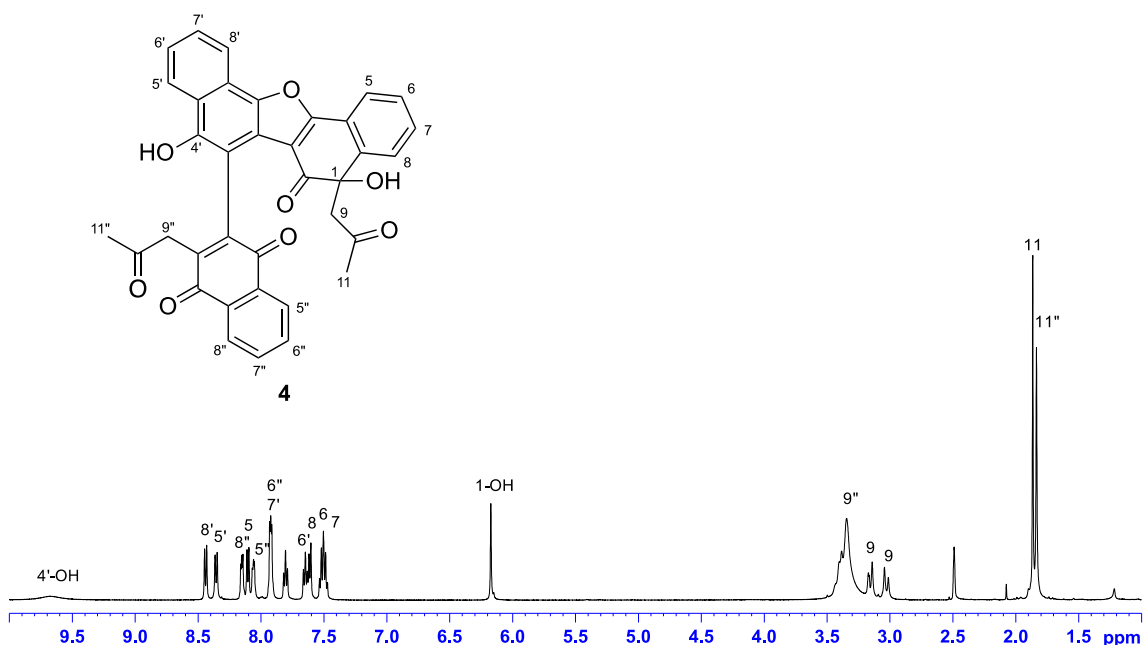


Figure 2.15.  $^1H$  NMR spectrum of rubiaquinone D (**4**) in  $DMSO-d_6$  (500 MHz).

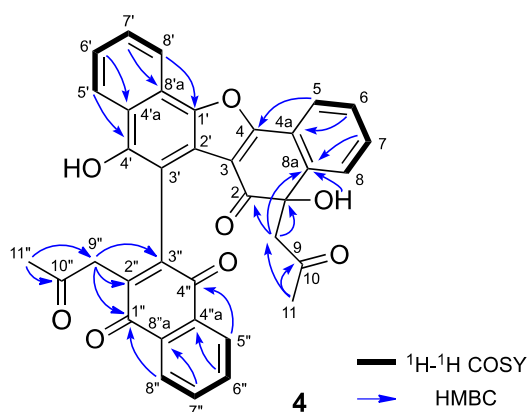


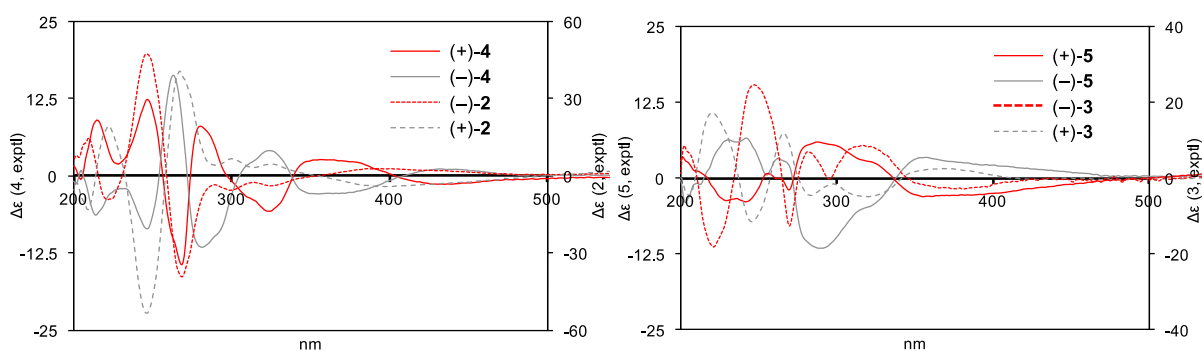
Figure 2.16. Selected 2D NMR correlations for rubiaquinone D (**4**).

**Table 2.2.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for rubiaquinones D (**4**) and E (**5**) in  $\text{DMSO-}d_6$ 

position	<b>4</b>		<b>5</b>	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ ( $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ ( $J$ in Hz)
1	75.6	–	75.6	–
2	194.5	–	193.8	–
3	113.9	–	113.8	–
4	161.7	–	161.9	–
4a	123.1	–	123.2	–
5	122.3	8.10 (1H, d, 7.3)	122.4	8.12 (1H, dd, 7.4, 1.3)
6	128.5	7.52 (1H, t, 7.3)	128.6	7.53 (1H, td, 7.4, 1.3)
7	130.5	7.49 (1H, t, 7.3)	130.7	7.50 (1H, td, 7.4, 1.3)
8	127.6	7.61 (1H, d, 7.3)	127.8	7.61 (1H, dd, 7.4, 1.3)
8a	143.7	–	143.6	–
9		3.15 (1H, d, 15.4)	54.4	3.12 (1H, d, 15.8)
		3.02 (1H, d, 15.4)		3.06 (1H, d, 15.8)
10	205.4	–	205.2	–
11		1.86 (3H, s)	30.9	1.88 (3H, s)
1-OH	–	6.17 (1H, s)	–	6.05 (1H, s)
1'	144.3	–	144.4	–
2'	119.8	–	120.1	–
3'	108.0	–	108.4	–
4'	147.8	–	147.9	–
4'a	124.3	–	124.4	–
5'	124.2	8.36 (1H, d, 8.3)	124.3	8.37 (1H, d, 8.3)
6'	126.1	7.65 (1H, d, 8.3)	126.2	7.66 (1H, t, 8.3)
7'	128.4	7.80 (1H, d, 8.3)	128.6	7.81 (1H, t, 8.3)
8'	119.9	8.44 (1H, d, 8.3)	120.0	8.44 (1H, d, 8.3)
8'a	121.0	–	121.1	–
4'-OH	–	9.67 (1H, brs)	–	9.57 (1H, s)
1''	185.1	–	185.3	–
2''	142.4	–	141.7	–
3''	144.5	–	144.6	–
4''	183.6	–	183.3	–
4''a	133.3	–	133.2	–
5''	126.5	8.06 (1H, m)	126.3	8.00 (1H, m)
6''	134.2	7.92 (1H, m)	134.3	7.92 (1H, m)
7''	133.7	7.92 (1H, m)	133.8	7.91 (1H, m)
8''	126.2	8.15 (1H, m)	126.2	8.15 (1H, m)
8''a	132.1	–	132.1	–
9''		3.42 (1H, d, 16.5)	43.2	3.46 (1H, d, 16.4)
		3.36 (1H, d, 16.5)		3.40 (1H, d, 16.4)
10''	203.6	–	203.7	–
11''		1.83 (3H, s)	29.9	1.88 (3H, s)

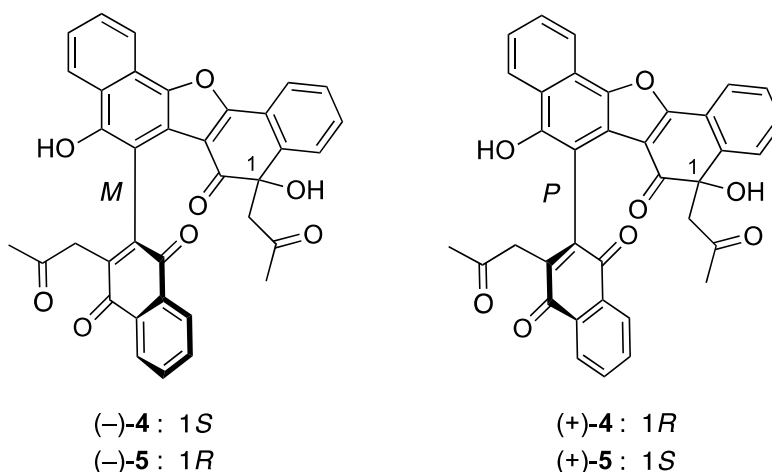
Rubiaquinone D (**4**)およびE (**5**)も旋光性を示さなかったことから、rubiaquinone B (**2**)およびC (**3**)と同様、C-1 キラル炭素と C-3/C-3"の不正軸に由来するラセミ体であると推定した。 **4** および **5** についてキラルカラムを用いて光学分割を行い、それぞれから(+)-体および(-)-体を得た。

光学分割した化合物の絶対立体配置の帰属を行うため、得られた化合物[(+)-**4**, (-)-**4**, (+)-**5**, および(-)-**5**]の ECD スペクトルの実測値を rubiaquinone B (**2**)およびC (**3**)の ECD スペクトルの実測値と比較した。 (+)-**4** および(-)-**4** の ECD スペクトルの実測値は(-)-**2** および(+)-**2** の ECD スペクトルの実測値とそれぞれよく対応していたため、(+)-**4** の絶対立体配置を(*P*,1*R*), (-)-**4** の絶対立体配置を(*M*,1*S*)と帰属した。



**Figure 2.17.** (A) Experimental ECD spectra of rubiaquinones B (**2**) and D (**4**) and (B) experimental ECD spectra of rubiaquinones C (**3**) and E (**5**).

一方、(+)-**5** および(-)-**5** の ECD スペクトルの実測値は(-)-**3** および(+)-**3** の実測値とよく対応していたことから、(+)-**5** および(-)-**5** の絶対立体配置を(+)-**5** をそれぞれ(*P*,1*S*)および(*M*,1*R*)と帰属した。



**Figure 2.18.** The structures of rubiaquinones D (**4**) and E (**5**).



#### 第4節 生物活性

*Rubia* 属から単離されている化合物は、抗がん、血小板凝集阻害、抗アレルギー、抗炎症等の活性を示すことが報告されている [4]。そのうち、ナフトキノンについては抗菌活性を有することが報告されている。そこで、単離した化合物のうち、(±)-rubiaquinone A (1), (±)-rubiaquinone E (5) および rubiarbonone A (6) について、*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* に対する抗菌活性試験を行った。その結果、(±)-rubiaquinone A (1) が *B. subtilis* に抗菌活性を示した (MIC, 4 µg/mL)。

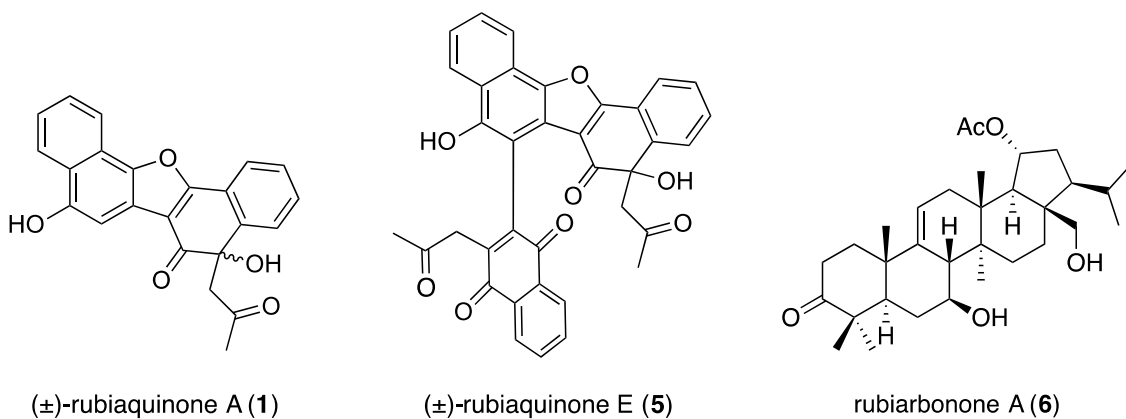


Figure 2.19. Compounds examined for their antimicrobial activities.

## 第5節 小活

*Rubia yunnanensis* の根から 5 種の新規化合物を含む 6 種の化合物を単離し、それらの構造を明らかにした。

Rubiaquinone A (1) は 1,4-dihydroxynaphthalene および 4-hydroxy-1,2-naphthoquinone からなるナフトキノン二量体である。Rubiaquinone B-E (2-5) は分子内に 1 つの不斉軸ならびに 1 つの不斉炭素をもつ、1,4-dihydroxynaphthalene, 4-hydroxy-1,2-naphthoquinone および 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone からなるユニークなナフトキノン三量体であった。天然物からのナフトキノン三量体には抗 HIV 活性を有する conocurvone [47] 等の単離報告があるが、その数は少なく非常に珍しい例である。また、*Rubia* 属からのナフトキノン三量体は今回が初の単離である。

Rubiaquinone A-E (1-5) は抽出溶媒にアセトンを使用したために生成した、ナフトキノン誘導体のアセトン付加体と考えられる。しかしながら、Rubiaquinone B-E (2-5) は分子内に不斉点と不斉軸を有する、構造解析のターゲットとして非常に興味深い化合物群である。

Rubiaquinone A-E (1-5) はラセミ体として得られ、キラルカラムを用いて光学分割した後、それぞれの絶対立体配置を帰属した。Rubiaquinone A (1) の絶対立体配置は、ECD スペクトルの実測値を TDDFT によって算出した計算値と比較する事で帰属した。Rubiaquinone B (2) および C (3) の絶対立体配置は ECD スペクトルの実測値と計算値の比較では帰属できなかったが、加算スペクトルを適応することでそれらの絶対立体配置を明らかにすることができた。この加算スペクトルは、複数の不斉中心あるいは不斉軸を有し、ECD スペクトルの比較による解析が困難な化合物に適応できる可能性がある。

Rubiaquinone A (1) について、*Bacillus subtilis* に対する抗菌活性を見いだした (MIC, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

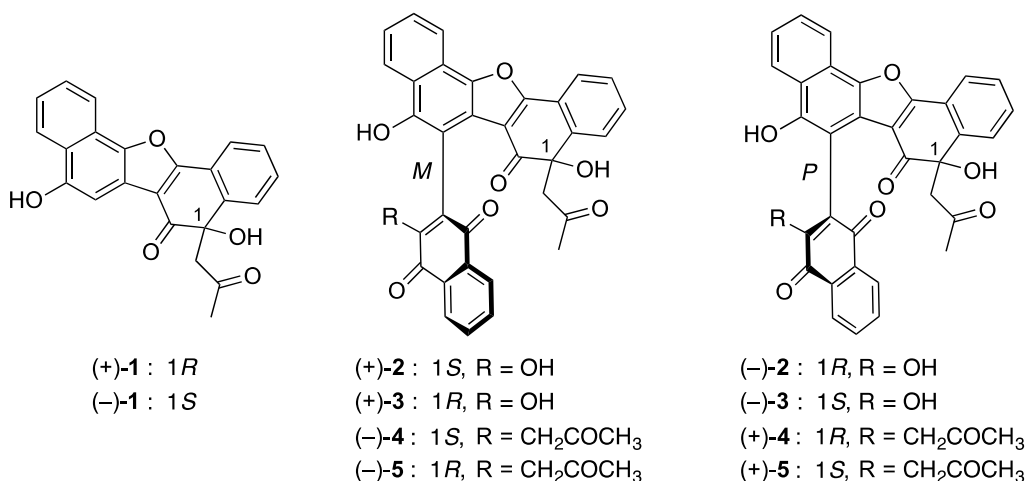


Figure 2.20. The structures of rubiaquinones A-E (1-5).

### 第3章 リンドウ科植物 *Gentiana rigescens* 地上部ならびに根および根茎の成分研究

#### 第1節 序論

##### 1) *Gentiana* 属植物について

*Gentiana* 属はリンドウ科 (Gentianaceae) 最大の属であり、約 400 種の植物が存在する。本属植物は苦味を有することで知られており、世界各地で食欲不振や消化不良の改善に用いられている [48].

日本薬局方には *Gentiana* 属植物を基原とする生薬として、ゲンチアナおよびリュウタン (竜胆) が収載されている。これらはいずれも根および根茎を薬用部位とするが、*Gentiana* 属植物の地上部を用いる伝統薬物もある。例えば、チベットでは *G. rhodantha* の地上部が肝炎や黄疸、咳の治療に使用されている [49]. また、モンゴルでは *G. aldidia* の地上部が発熱やのどの痛み、肺および眼の感染症の治療に用いられている [45].

##### 2) *Gentiana* 属植物の成分について

本属植物の成分としてはイリドイド類、キサントン類、フラボノイド、トリテルペン類が報告されている。

イリドイド類は *Gentiana* 属植物に特徴的な苦味を呈する含有成分で、シクロペンタノピラン環を特徴とするイリドイド型 (loganic acid など)、イリドイド型の C-7/C-8 間でシクロペンタン環が開裂し、C-7/C-11 間でラク톤を形成するセコイリドイド型 (gentiopicroside など) に分類される。これらの多くは配糖体として存在しており、糖の結合していない遊離型イリドイドの単離報告は少ない [50].

キサントン類は地上部からの報告が多く、ポリメトキシキサントン (decussatin や gentiacaulein など) が本属に特徴的な成分である [48]. *Gentiana* 属植物に含有されるフラボノイドは 6-C-配糖体 (isoorientin など) が多く報告されている [48]. 本属植物はトリテルペン類も豊富に含んでおり、オレアナン型やウルサン型は本属植物の全草から広く単離されている。一方、gentirigenic acid 等のダマラン型、ルパン型やホパン型トリテルペンは根および根茎からの報告が多い [48].

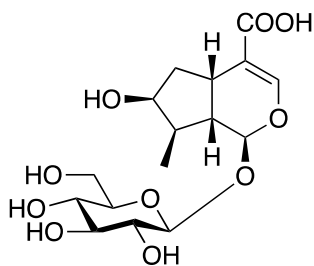
##### 3) *Gentiana rigescens* について

*Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl. (漢名：坚龙胆) は、中国南西部、特に雲南省の山間部に自生する [51]. 日本薬局方では生薬「リュウタン」の基原植物として、*G. scabra*, *G. triflora*, および *G. manshurica* の根および根茎が規定されているが、中国薬典では「龙胆」として、上記3種に加え *G. rigescens* もその基原植物として規定されている [52,53]. リュウタンはゲンチアナと同様、苦味健胃薬として用いられるが、中国では肝炎、胆嚢炎、リウマ

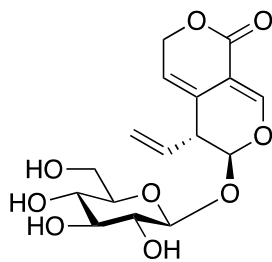
チ，結核などの治療にも用いられている [52,54]。主要薬効成分であるセコイリドイド配糖体 gentiopicroside の含有率は *G. triflora*, *G. rigescens*, *G. manshurica*, *G. scabra* の順で多いとの報告がある [54]。本植物の成分に関しては肝保護作用や鎮痛作用を示す種々のイリドイド配糖体およびセコイリドイド配糖体が単離・報告されている [54]。

当研究室が行った雲南省における調査で，少数民族のイ族が本植物の根および根茎を肝炎や胆嚢炎の治療に用いている事が明らかとなった。そこで著者は，雲南省にて購入した本植物全草を地上部と根および根茎に分けた後，それぞれの部位について成分探索を行った。

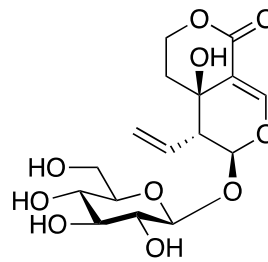
### iridoids



loganic acid

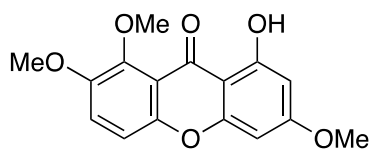


gentiopicroside

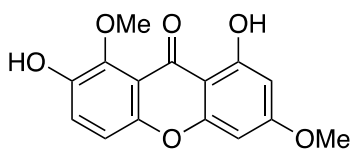


swertiamarin

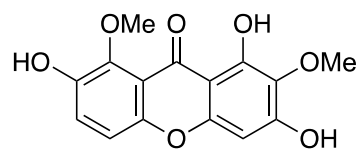
### xanthenes



decussatin

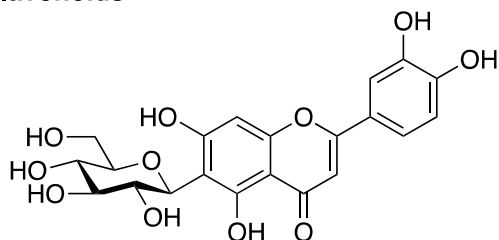


gentiacaulein

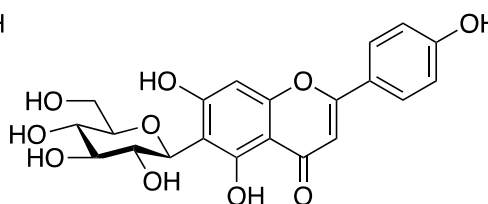


rhodanthenone D

### flavonoids

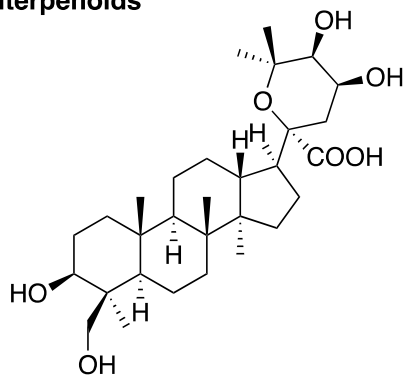


isorientin

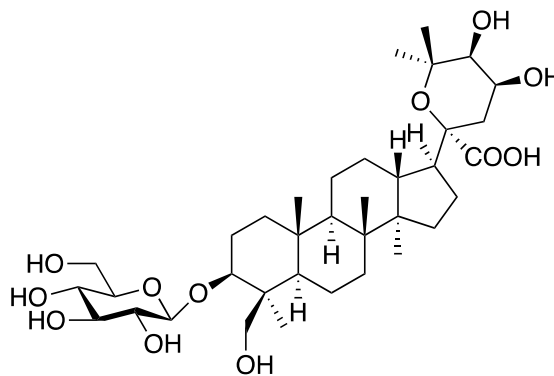


isovitexin

### triterpenoids



gentirigenic acid



gentirigenoside A

**Figure 3.1.** Compounds previously isolated from *Gentiana* plants.

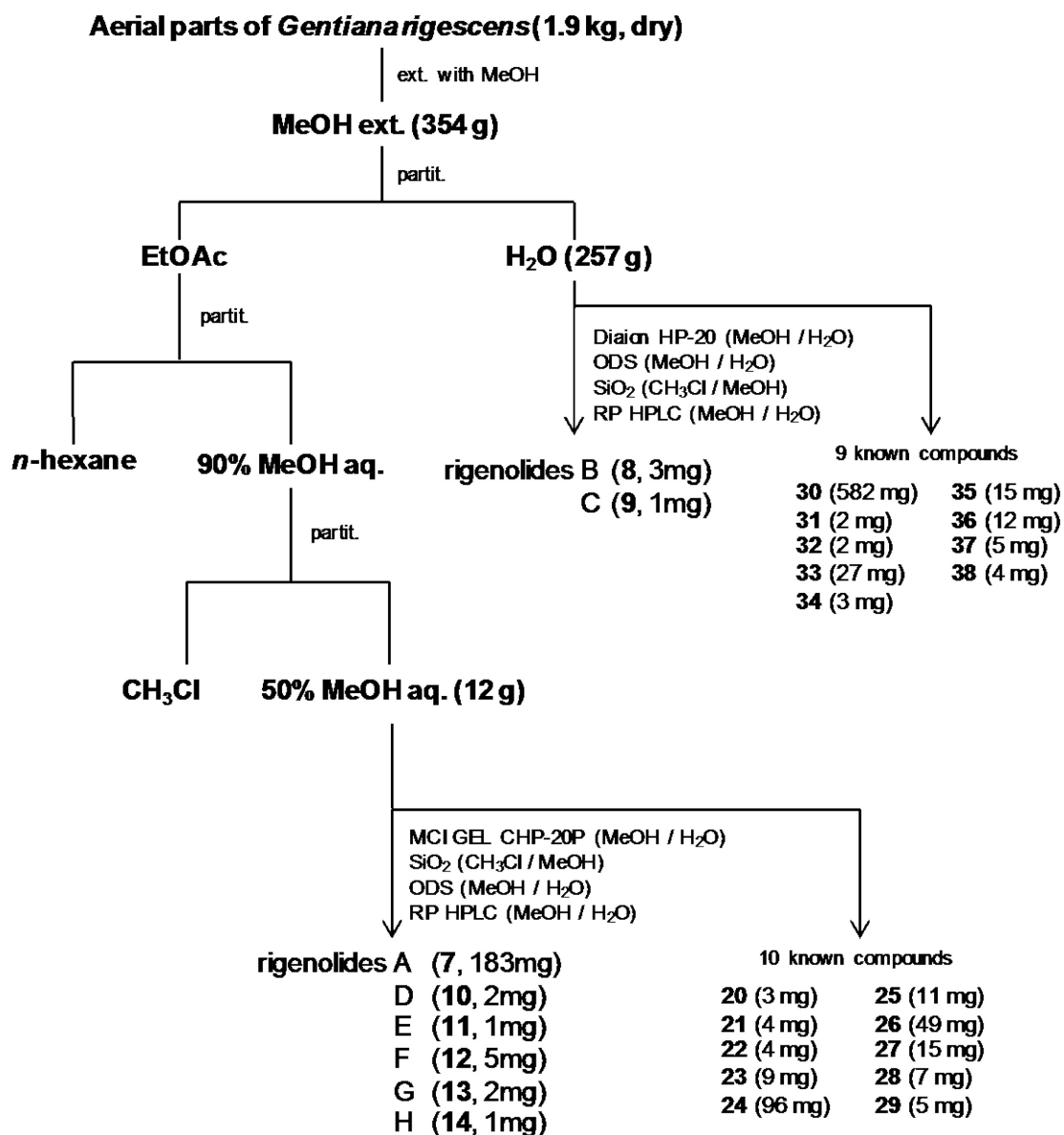
## 第2節 抽出・分離

### 第1項 *Gentiana rigescens* 地上部の抽出・分離

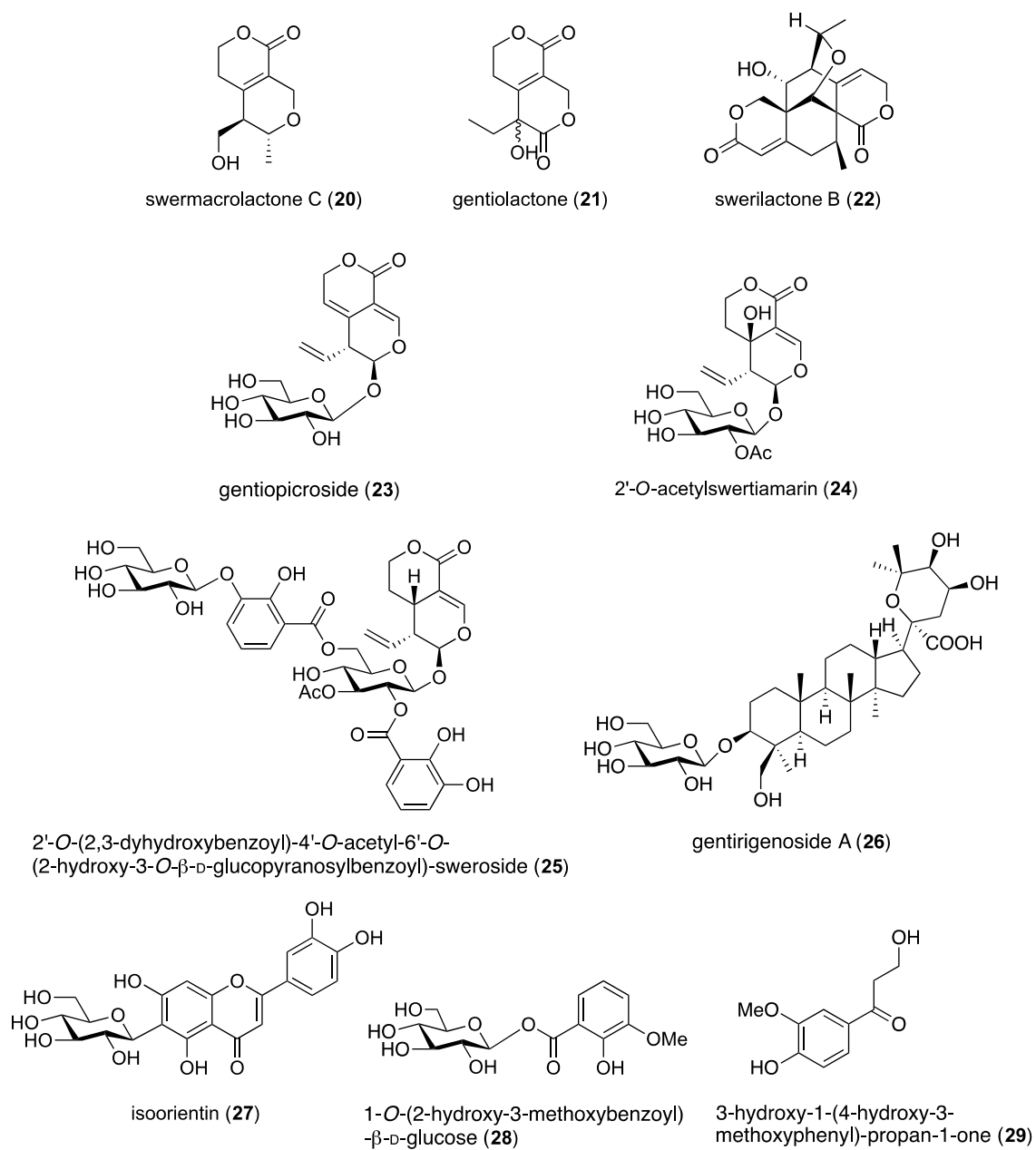
2008年に雲南省にて購入した *Gentiana rigescens* の地上部 (1.9 kg, dry) を MeOH で冷浸抽出し, MeOH エキス (354 g) を得た. これを EtOAc と H<sub>2</sub>O で溶媒間分配後, EtOAc 可溶各分をさらに *n*-hexane と 90% MeOH aq. で分配した. 90% MeOH aq. を分配して得た 50% MeOH aq. 可溶画分 (12 g) を MCI GEL CHP-20P カラムを用いて分離し, イリドイド含有画分を得た. この画分を SiO<sub>2</sub> ならびに ODS カラムを用いて分離した後, 逆相 HPLC で精製し, 6 種の新規化合物 **rigenolide A (7)** および **D-H (10-12)** を単離した (Scheme 3.1).

新規化合物分離の過程で 9 種の既知化合物を単離し, 各種スペクトルデータを文献値と比較することで, それぞれ **swermacrolactone C (20)** [55], **gentiolactone (21)** [56], **swerilactone B (22)** [57], **gentiopicroside (23)** [72], **2'-O-acetylswertiamarin (24)** [58], **2'-O-(2,3-dihydroxybenzoyl)-4'-O-acetyl-6'-O-(2hydroxy-3-O-β-D-glucopyranosylbenzoyl)-sweroside (25)** [59], **gentirigenoside A (26)** [51], **isoorientin (27)** [60], **1-O-(2-hydroxy-3-methoxybenzoyl)-β-D-glucose (28)** [61], **3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3methoxyphenyl)-propan-1-one (29)** [62] と同定した (Fig. 3.2).

一方, H<sub>2</sub>O 可溶画分 (257 g) について, Diaion HP-20 を用いて糖類を除去したのち, ODS カラムに付しイリドイド含有画分を得た. これらをさらに SiO<sub>2</sub> カラムを用いて分離したのち, 逆相 HPLC により精製し, 新規セコイリドイド誘導体 **rigenolide B (22)** および **C (23)** を単離した (Scheme 3.1). 分離の過程で 9 種の既知化合物を単離し, 各種スペクトルデータを文献値と比較することでそれぞれ **loganic acid (30)** [63], **swertiajaposide D (31)** [64], **gentianol (32)** [65], **6'-O-β-D-glucosyl-gentiopicroside (33)** [66], **olivieroside C (34)** [67], **di-O-methylcrenatin (35)** [78], **potalioside B (36)** [69], **4-(hydroxymethyl)-2-methoxyphenol-β-D-glucopyranoside (37)** [70], **(+)-jatroitelignan D 4-O-β-D-glucopyranoside (38)** [71] と同定した (Fig. 3.3).

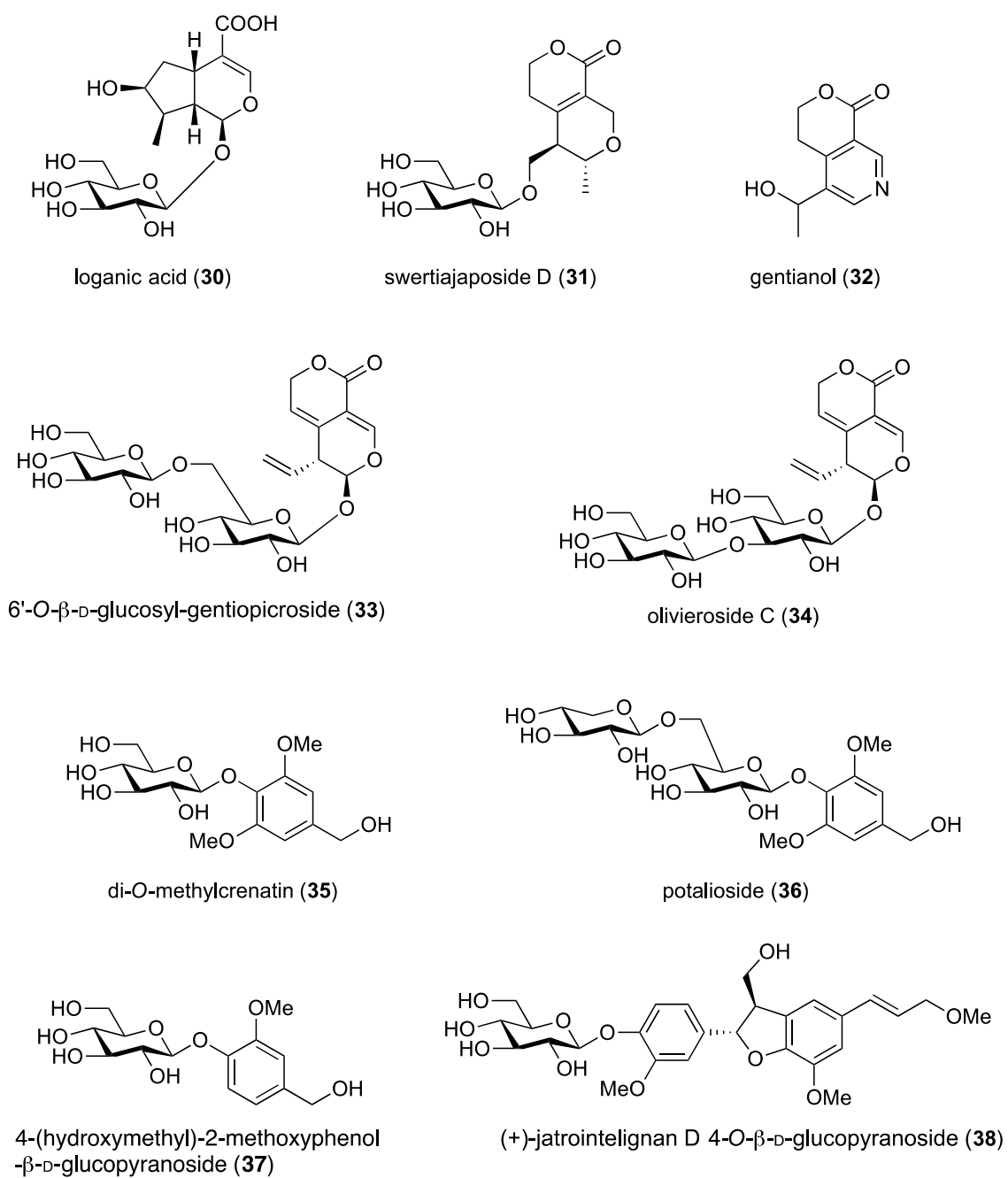


**Scheme 3.1.** Isolation scheme for rigenolides A–H (7–14).



**Figure 3.2.** Known compounds isolated from 50% MeOH aq.-soluble material of the aerial parts of *G. rigescens*.

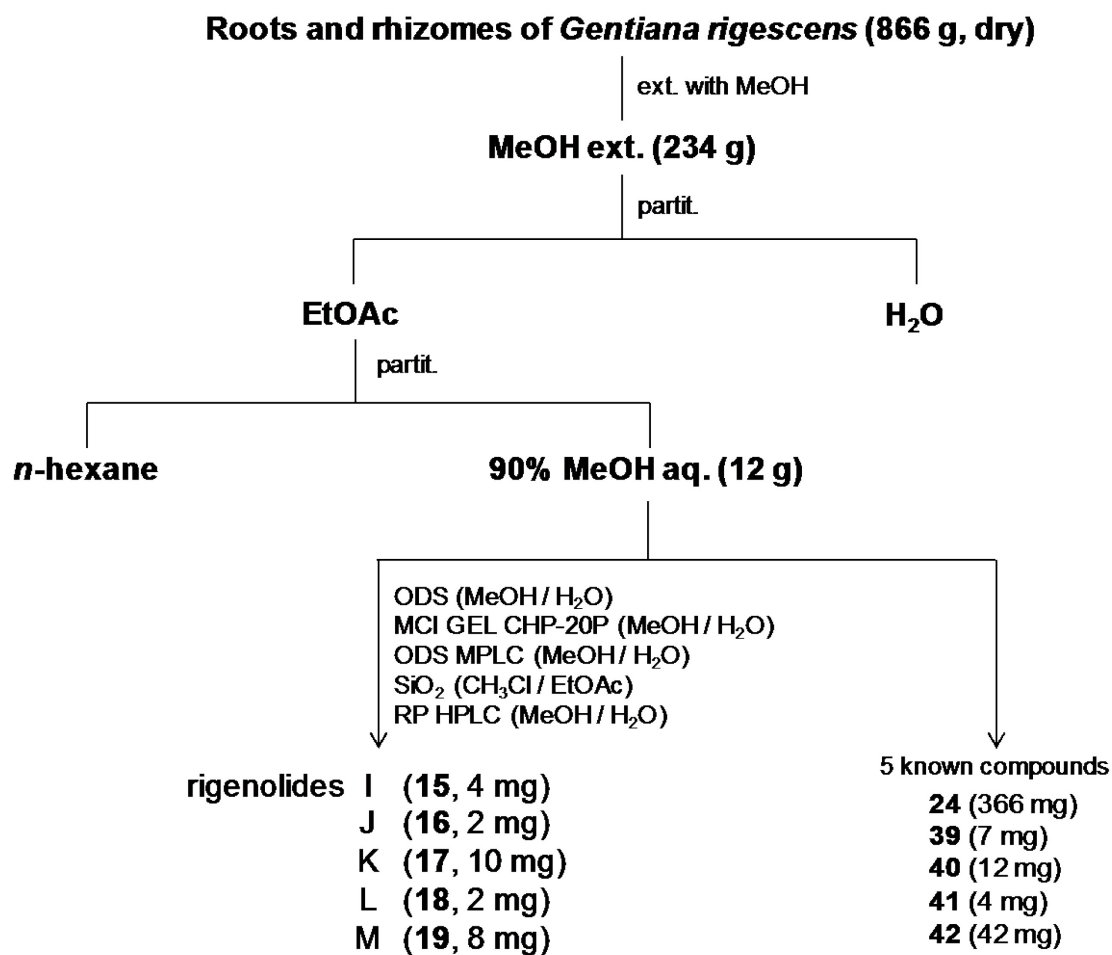




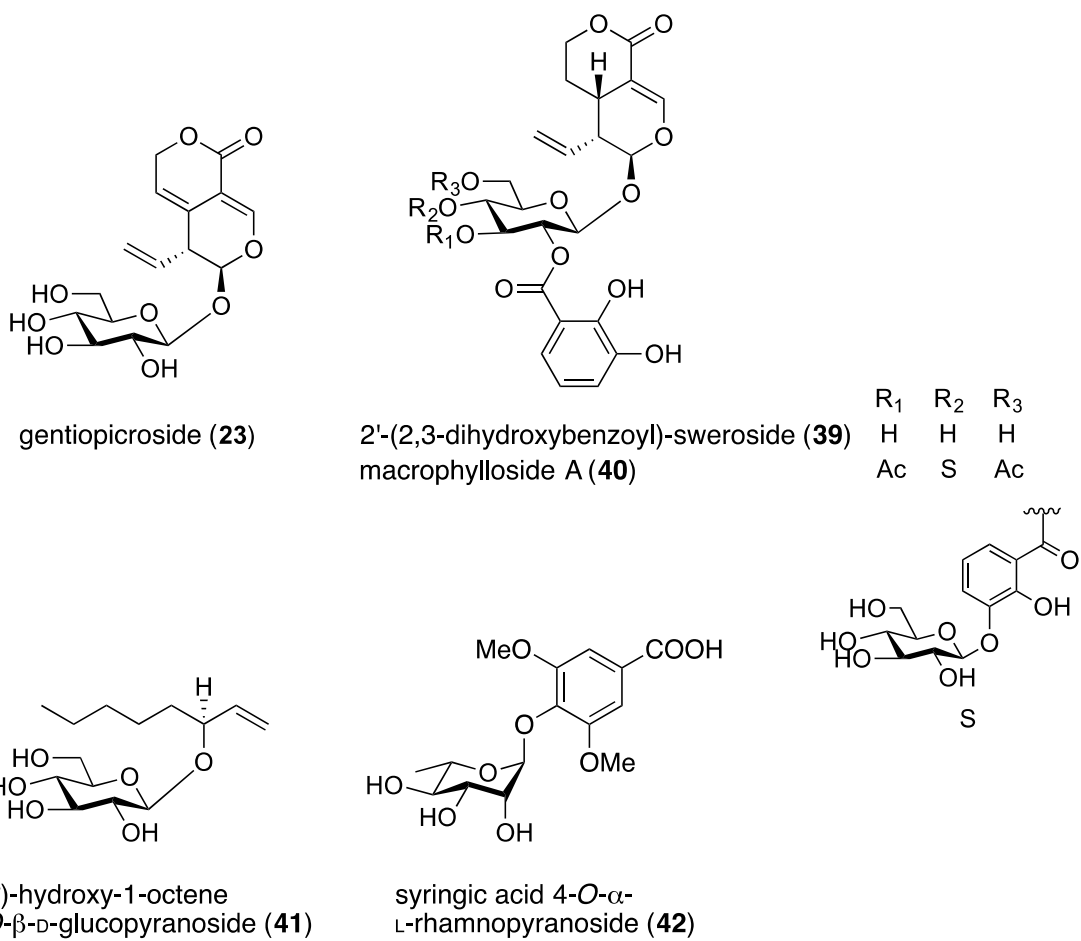
**Figure 3.3.** Known compounds isolated from H<sub>2</sub>O-soluble material of the aerial parts of *G. rigescens*.

第2項 *Gentiana rigescens* 根および根茎の抽出・分離

*G. rigescens* の根および根茎 (866 g) を MeOH で冷浸抽出し, MeOH エキス (234 g) を得た. これを EtOAc と H<sub>2</sub>O で溶媒間分配し, 得られた EtOAc 可溶部をさらに *n*-hexane と 90% MeOH aq. で溶媒間分配した. 得られた 90% MeOH aq. 可溶部 (12 g) を ODS, MCI GEL CHP-20P, ODS MPLC および SiO<sub>2</sub> カラムを用いて分離後, 逆相 HPLC で精製し, 5 種の新規化合物を単離した (Scheme 3.2). 分離の過程で gentiopicroside (**24**) [72], 2'-*O*-(2,3-dihydroxybenzoyl)-sweroside (**39**) [73], macrophyllouside A (**40**) [74], 3(*S*)-hydroxy-1-octene 3-*O*-β-D-glucopyranoside (**41**) [75], syringic acid 4-*O*-α-L-rhamnopyranoside (**42**) [76] を単離・同定した (Fig. 3.4).



Scheme 3.2. Isolation scheme for rigenolides I–M (15–16).



**Figure 3.4.** Known compounds isolated from 90% MeOH aq.-soluble material of the roots and rizomes of *G. rigescens*.

### 第3節 新規化合物の構造解析

#### 第1項 Rigenolide A (7)の構造解析

Rigenolide A (7)は光学活性な淡黄色非晶性固体として得られた $\{[\alpha]_D^{17} -74.2 (c 1.05, \text{MeOH})\}$ . HRESIMS $\{m/z 543.1462 [M+Na]^+, \text{calcd for } C_{25}H_{28}O_{12}Na, 543.1478\}$ より分子式は $C_{25}H_{28}O_{12}$ と帰属した.

Rigenolide A (7)の $^1\text{H}$  NMR スペクトルでは, 1個のビニル基 [ $\delta_{\text{H}}$  5.74 (1H, m), 5.34 (1H, d,  $J=17.0$  Hz), 5.32 (1H, d,  $J=10.5$  Hz)], 1個のアセタール炭素 [ $\delta_{\text{H}}$  5.18 (1H, d,  $J=4.5$  Hz)], および1個のアノメリックプロトン [ $\delta_{\text{H}}$  4.84 (1H, d,  $J=8.0$  Hz)]を含む糖由来のシグナルが観測された. これらは swertiamarin [77,78]のそれらと良く類似していたが, 7では swertiamarinの3位の オレフィンプロトンに帰属されるシグナルが観測されず, 1,4-二置換ベンゼン [ $\delta_{\text{H}}$  7.09 (2H, d,  $J=8.5$  Hz), 6.69 (2H, d,  $J=8.5$  Hz)]に由来するシグナルが確認された. 7の $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは, 2個のエステルカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  175.5, 174.5), 1個のアセタール炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  101.7), 1個のオキシメチン ( $\delta_{\text{C}}$  72.0), および1個の $\text{sp}^3$  四級炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  57.0)の存在が示された. 加えて, 1個のアノマー炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  99.2)を含む6本の糖由来のシグナルが観測され, そのケミカルシフト値からグルコースであることが示唆された.

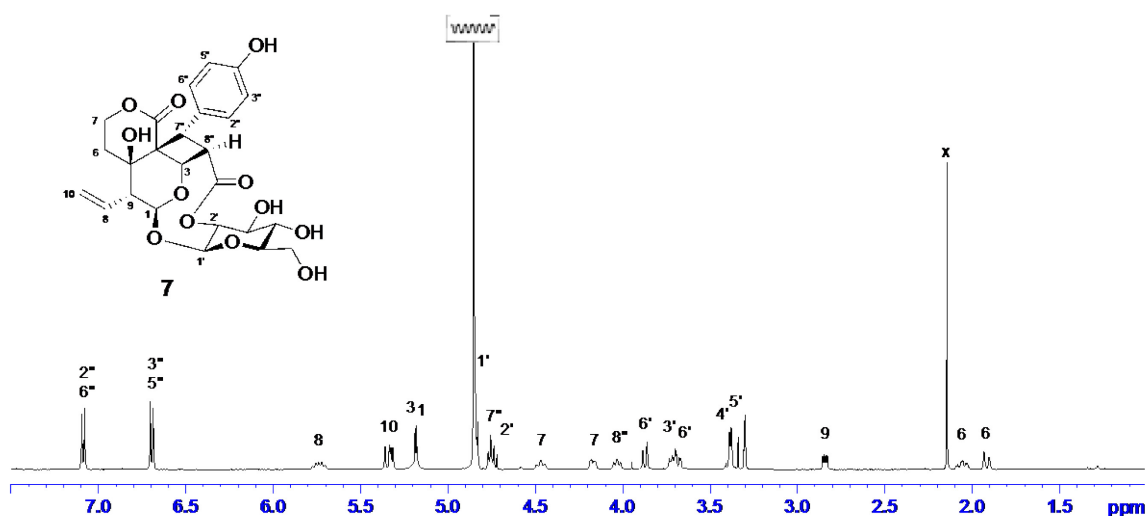
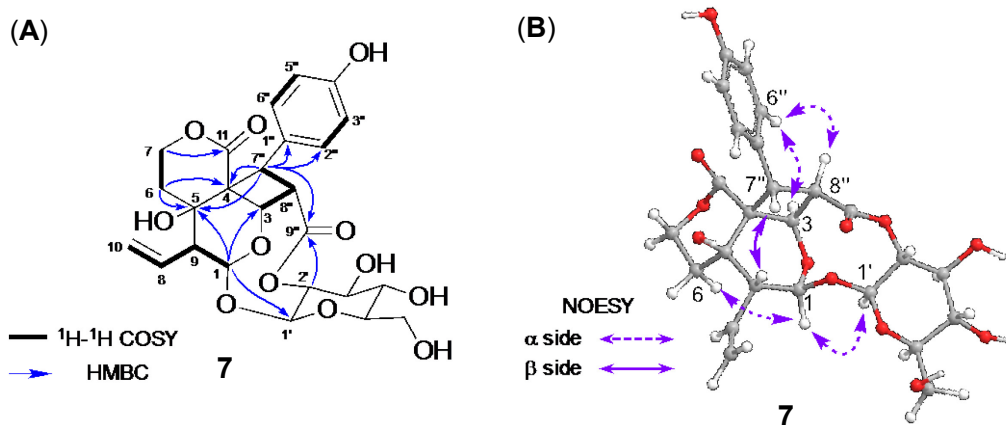


Figure 3.5.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide A (7) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

平面構造解析のため 2D NMR を解析した. H-1-H-9-H-8-H-2-10 間, H-2-H-7 間の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 相関および H-1 と C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  72.0), C-5, および C-1'間, H-2-6 と C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  57.0)および C-5 間, H-2-7 と C-11 間の HMBC 相関より, セコイリドイド配糖体部分 (C-1-C-10 および C-1'-C-6')の存在が明らかとなった. 一方,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルにおいて H-2"-H-3"のスピン結合が確認され, HMBC スペクトルにおいて, H-7"と芳香族炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  81.0)およびエステルカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  175.5)間に相関が見られた. また, グルコースの2位プロトンとエステ

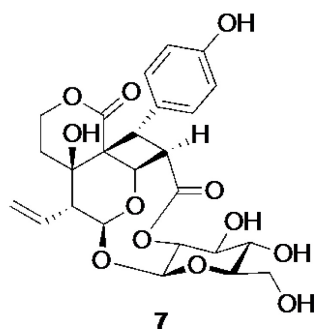
ルカルボニル炭素間に HMBC 相関が観察されたことから、グルコースの 2 位に結合した C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> ユニットの存在が判明した。さらに、H-3-H-2"間の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 相関および H-3"と C-4 および C-5 間の HMBC 相関が確認されたことから、セコイリドイド配糖体部分と C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> ユニットの C-3-C-2", C-4-C-3"で結合しシクロブタン環を形成していることが明らかとなった。以上の解析により、平面構造を Fig. 3.6 (A)に示す構造と帰属した。



**Figure 3.6** (A) Selected 2D NMR correlations and (B) selected NOESY correlations and relative stereochemistry for rigenolide A (7).

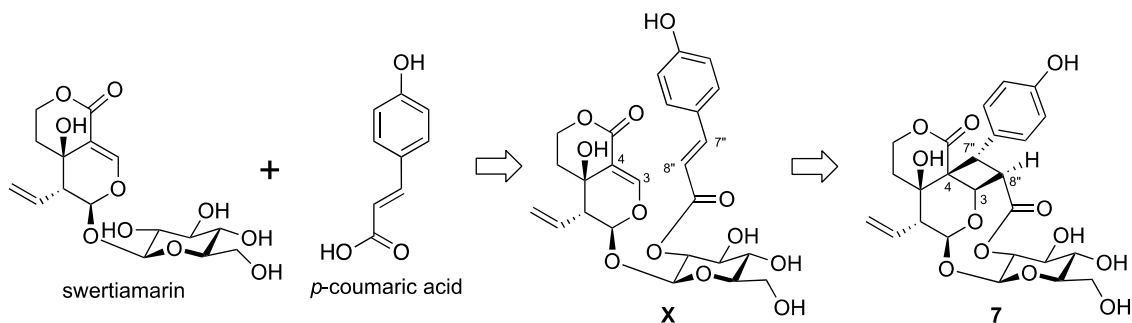
NOESY スペクトルにおける H-9/H-7"間の相関 [Fig. 3.6 (B)]から、これらのプロトンがセコイリドイド部分の β 側に存在すると推定した。一方、H-6a/H-1 間と H-1/H-1'間に NOESY 相関が観測されたため、これらのプロトンが α-配置をとることが明らかになった。さらに、H-3/H-6"間と H-6"/H-8"間の相関から H-3, H-8", および 7"位に結合する *p*-ヒドロキシフェニル基 (C-1"-C-6")を α 配置と帰属した。

以上の結果から、rigenolide A (7)の相対配置を Fig.3.6.B に示した配置と帰属した。7 の酸加水分解により得たグルコースが正の旋光度を示したことから、グルコースを D 体と帰属した。以上の結果から rigenolide A (7)の絶対立体配置を含めた構造を Fig. 3.7 に示す構造と結論した。



**Figure 3.7.** Structure of rigenolide A (7).

Rigenolide A (7)は、シクロブタン環と九員環ラク톤を含むユニークな五環性の構造を持つ新規セコイリド配糖体であり、2'-*O*-coumaroylswertiamarin (X)の [2+2] 環化付加により生合成されると考えられる (Scheme 4). これまでに、2'-*O*-coumaroylswertiamarin (X)の単離報告はないが、X と類似の構造を持つ olivieroside A および B が *Gentiana olivieri* から[67], 4'-*O*-Coumaroylswertiamarin, および 6'-*O*-coumaroylswertiamarin がリンドウ科植物 *Swertia milensis* から単離・報告されている[78].



Scheme 3.3. Possible biogenetic pathway of rigenolide A (7).

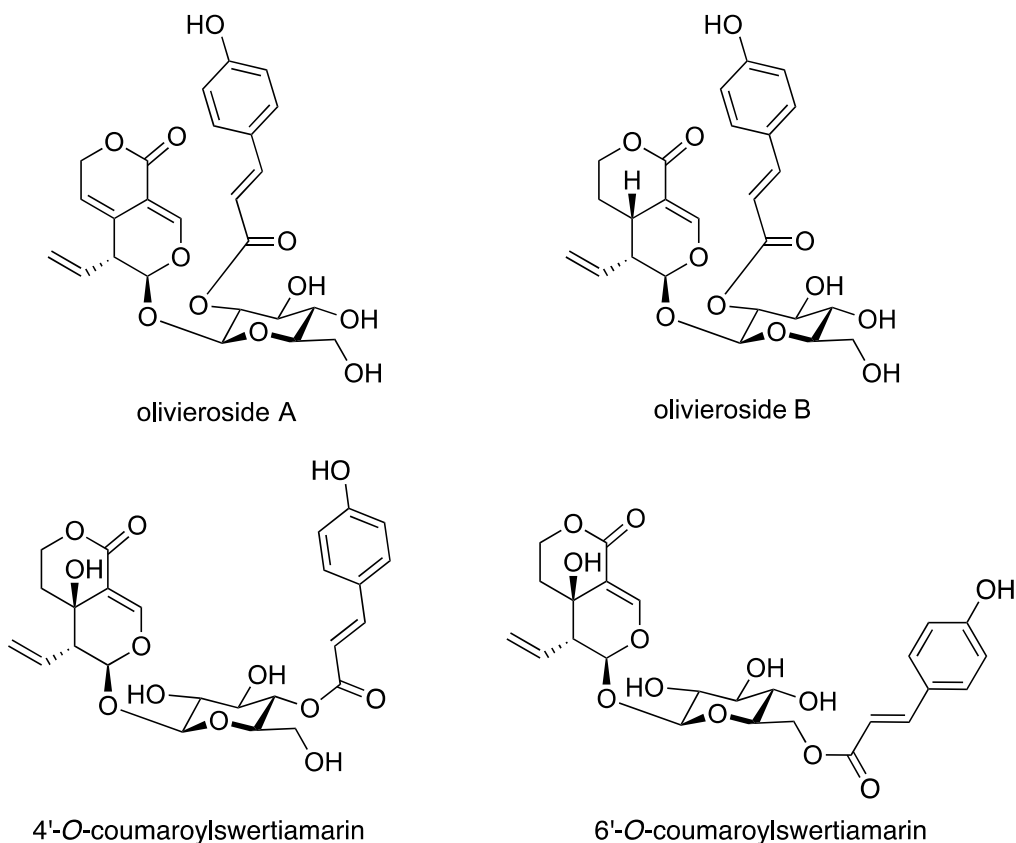


Figure 3.8. Structures of *p*-coumaroyl secoiridoid glucosides previously isolated from Gentianeaceae plants.

**Table 3.1.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for rigenolide A (7) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5.18 (1H, d, 4.5)	101.7
3	5.19 (1H, m)	72.0
4	-	57.0
5	-	69.3
6	2.06 (1H, ddd, 14.5, 12.0, 4.5)	34.2
	1.92 (1H, br d, 14.5)	
7	4.47 (1H, br t, 12.0)	65.5
	4.17 (1H, dd, 12.0, 4.5)	
8	5.74 (1H, 17.0, 10.5, 9.0)	133.8
9	2.84 (1H, dd, 9.0, 4.5)	52.6
10	5.34 (1H, d, 17.0)	122.3
	5.32 (1H, d, 10.5)	
11	-	174.5
1'	4.84 (1H, d, 8.0)	99.2
2'	4.73 (1H, m)	81.0
3'	3.71 (1H, m)	74.5
4'	3.38 (1H, m)	71.8
5'	3.38 (1H, m)	79.7
6'	3.87 (1H, dd, 11.5, 1.5)	62.5
	3.68 (1H, m)	
1''	-	130.5
2''	7.09 (2H, d, 8.5)	129.7 (2C)
3''	6.69 (2H, d, 8.5)	116.0 (2C)
4''	-	157.3
7''	4.76 (1H, m)	42.3
8''	4.03 (1H, dd, 10.5, 8.5)	49.0
9''	-	175.5

## 第2項 Rigenolide I (15)およびJ (16)の構造解析

Rigenolide I (15)は無色油状物質として得られ、比旋光度+1.8 ( $c$  0.04,  $\text{CHCl}_3$ )を示した。HRESIMS  $\{m/z$  207.0636  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4\text{Na}$ , 207.0633}より 15 の分子式は  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$  と判明した。

$^1\text{H}$  NMR スペクトルから、1個の *sec*-メチル [ $\delta_{\text{H}}$  1.35 (3H, d,  $J$  = 6.5 Hz)], 1個のオキシメチレン [ $\delta_{\text{H}}$  4.38 (2H, m)], 2個のオキシメチン [ $\delta_{\text{H}}$  5.83 (1H, s) and  $\delta_{\text{H}}$  4.46 (1H, m)]の存在が示唆された。また、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルから、1個のエステルカルボニル炭素 [ $\delta_{\text{C}}$  162.4], 1個のアセタール炭素 [ $\delta_{\text{C}}$  88.0]を含む9個の炭素の存在が示された。

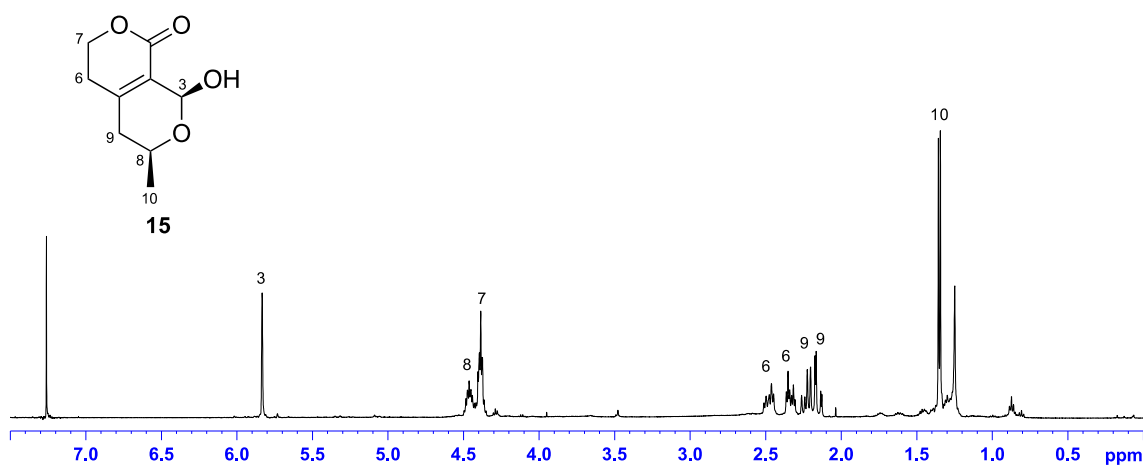


Figure 3.9.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide I (15) in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

Rigenolide I (15)の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルの解析により C-6-C-7, C-9-C-8-C-10 の部分構造の存在が明らかとなった。さらに HMBC スペクトルにおいて、H-3 と C-4, C-5, および C-8 間, H-6 と C-4 および C-5 間, H-7 と C-11 間, H-9 と C-4, C-5, および C-6 間にそれぞれ相関が見られたことから {Fig. 3.10 (A)}, 15 は swercinctolide B [79]と同一の平面構造を有する事が明らかとなった。

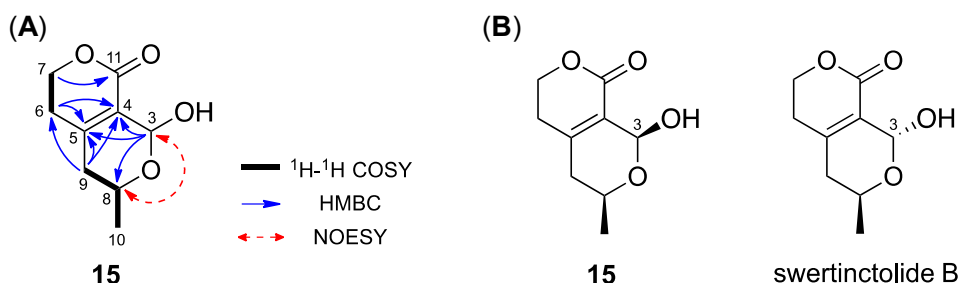


Figure 3.10. (A) Selected 2D NMR correlations for 15 and (B) structure of rigenolide I (15) and swertinctolide B.



Rigenolide I (**33**)の NOESY スペクトルで、H-3 と H-8 間に NOE 相関が見られたため、H-3 と H-8 は 1,3-ジアキシャルの関係にあることが明らかとなり、**15** は swercinctolide B [79]の epimer であると結論した {Fig.3.10.(B)}. なお、swercinctolide B は比旋光度の絶対値が 16.0 であったことに対し [79], Rigenolide I (**15**)は比旋光度の絶対値が 1.8 と小さかった事から部分ラセミ体であると推定している。

Rigenolide J (**16**)は無色油状物質として得られた  $\{[\alpha]_D^{28} - 7.6 (c 0.12, \text{CHCl}_3)\}$ . HRESIMS  $\{m/z 221.0789 [M+Na]^+, \text{calcd for } \text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Na}, 221.0790\}$ より **16** の分子式は  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$  と帰属した。

Rigenolide J (**16**)の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは rigenolide I (**15**)のそれらとよく対応していたが、**16** ではメトキシ基に由来するシグナル  $[\delta_{\text{H}} 3.49 (3\text{H}, \text{s}); \delta_{\text{C}} 55.7]$ が新たに観測された。2D NMR スペクトルを測定したところ、**15** と同様の相関に加え、メトキシプロトンとアセタール炭素 (C-3)間に HMBC 相関が見られたことから、**16** は **15** の 3 位にメトキシ基が結合した構造であることが明らかとなった。

以上の結果から rigenolide J (**16**)の平面構造を Fig. 3.12 に示す構造と帰属した。**16** の立体配置については未帰属である。

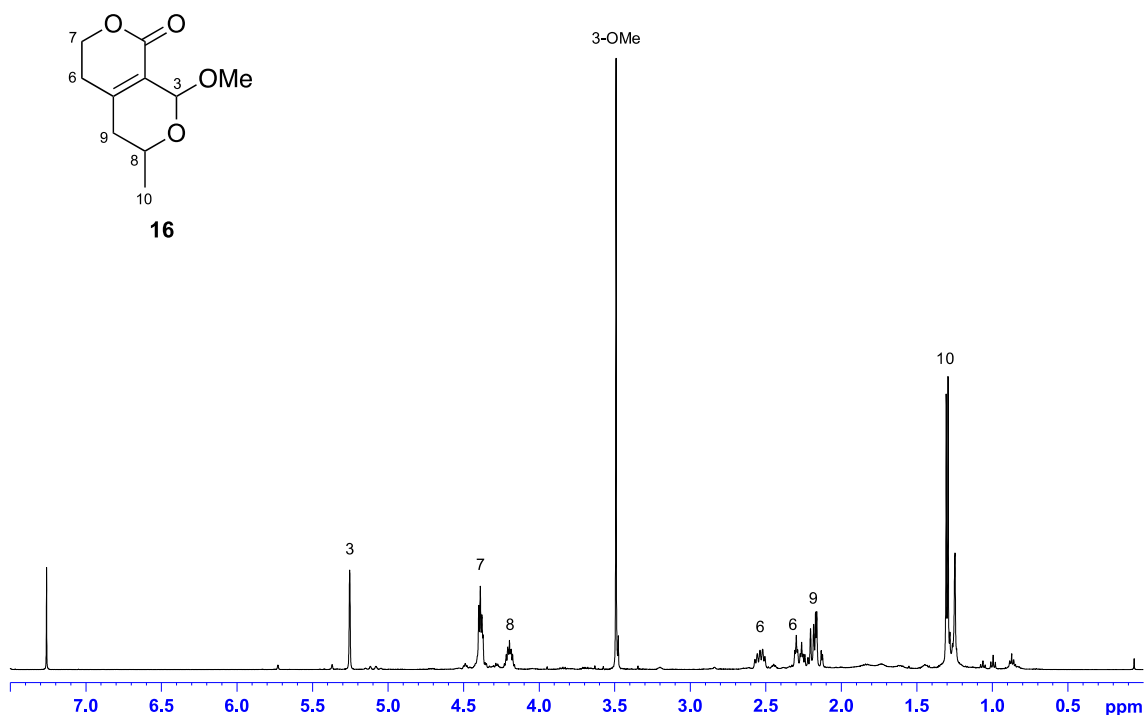
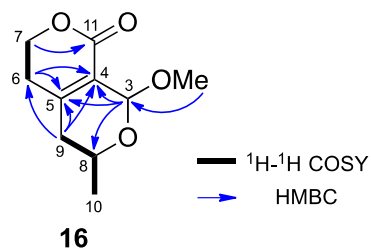


Figure 3.11.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide J (**16**) in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

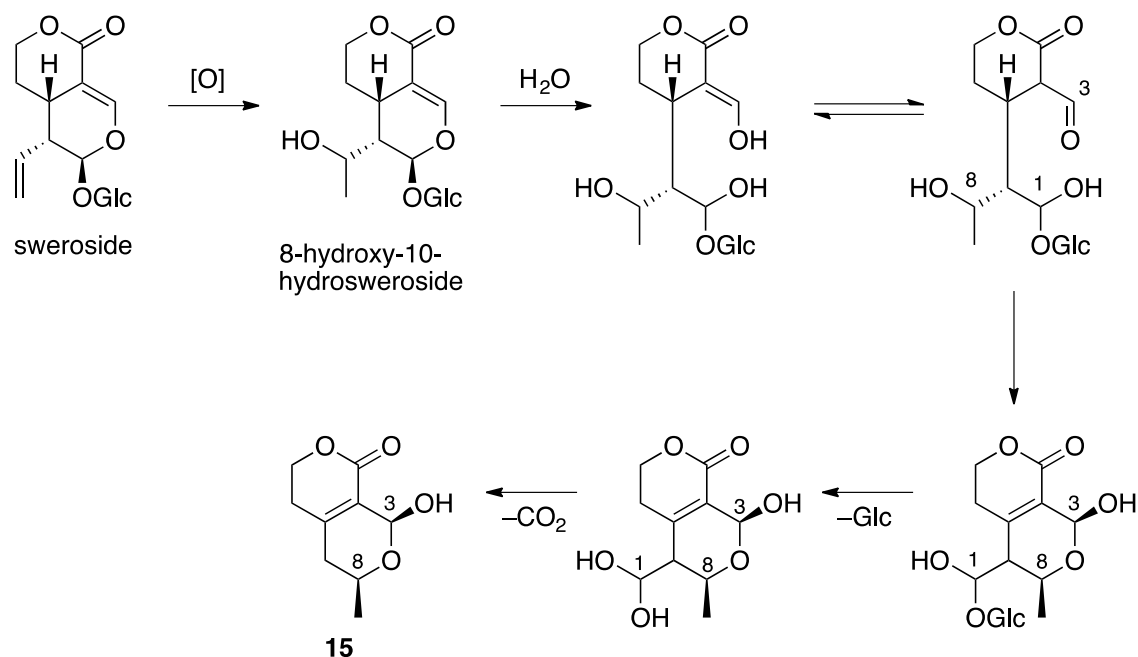


**Figure 3.12.** Selected 2D NMR correlations for rigenolide J (**16**).

**Table 3.2.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for rigenolides I (**15**) and J (**16**) in  $\text{CDCl}_3$ .

<b>15</b>			<b>16</b>	
Position	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
3	5.83 (1H, s)	88.0	5.25 (1H, s)	94.1
4	-	123.2	-	123.7
5	-	154.1	-	153.0
6	2.48 (1H, m)	28.5	2.54 (1H, m)	28.5
	2.33 (1H, ddd, 18.0, 5.5, 5.5)		2.28 (1H, ddd, 17.5, 4.5, 4.5)	
7	4.38 (2H, m)	65.3	4.38 (2H, m)	65.2
8	4.46 (1H, m)	62.2	4.20 (1H, m)	61.3
9	2.23 (1H, dd, 19.0, 10.5)	36.8	2.21 (1H, dd, 19.0, 10.0)	36.8
	2.15 (1H, dd, 19.0, 4.0)		2.15 (1H, dd, 19.0, 4.5)	
10	1.35 (3H, d, 6.5)	20.5	1.30 (3H, d, 6.5)	20.7
11	-	162.4	-	162.4
3-OMe	-		3.49 (3H, s)	55.7

今回 *G. rigencens* の根から単離した rigenolide I (15) はセコイリドイド配糖体から生合成されるノルイリドイドであると考えられる。すなわち, sweroside [80] を出発物質とし, ビニル基が酸化されたのち, 1 位アセタールの開環が起こり, 3 位と 8 位での分子内環化反応, 脱グリコシル, 脱炭酸を経て生成すると推定される。



**Scheme 3.4.** Plausible biogenetic pathway of rigenolide I (15).

これまでに報告されているノルイリドイドの多くはイリドイド型である [82-89], セコイリドイド型のは数例のみであり [79,90,91], rigenolide I (15) および J (16) は新規性の高い化合物といえる。

### 第3項 Rigenolide B (8)およびC (9)の構造解析

Rigenolide B (8)は光学活性 $\{[\alpha]_D^{20} -72.0 (c 0.31, \text{MeOH})\}$ な無色非晶性固体として得られ、HRESIMS  $\{m/z 545.1617 [M+Na]^+, \text{calcd for } C_{25}H_{30}O_{12}Na, 545.1635\}$ より分子式を  $C_{25}H_{30}O_{12}$  と帰属した。1D NMR スペクトルにおいて, gentiopicroside [72]に対応するシグナル(C-1–C-11, C-1'–C-6')および rigenolide I (15)に対応するシグナル (C-3"–C-11")が観察された。さらに, H-3"から C-6'間の HMBC 相関から, C-6'と C-3"が酸素原子を介して結合していることが明らかとなった。したがって, rigenolide B (8)の平面構造を, セコイリドイドに結合した糖の6位にさらにノルセコイリドイドが結合した構造と帰属した。

Rigenolide C (9)の分子式は 8 と同一の  $C_{25}H_{30}O_{12}$  であることが明らかとなった  $\{m/z 545.1653 [M+Na]^+, \text{calcd for } C_{25}H_{30}O_{12}Na, 545.1635\}$ 。9 の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは, 8 とよく類似したスペクトルを示したが (Table 3.3), C-5'と C-3"のケミカルシフトにわずかな違いが見られた。NOESY スペクトルの解析は rigenolide B (8)および C (9)がいずれも H-3"/H-8"-*syn* 配置をもつことを示唆した。

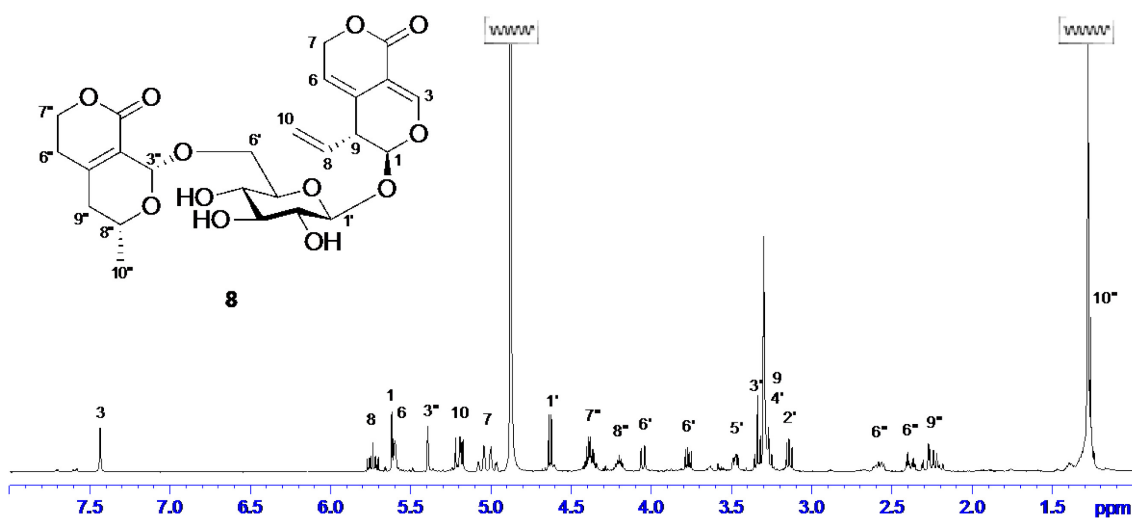


Figure 3.13.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide B (8) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

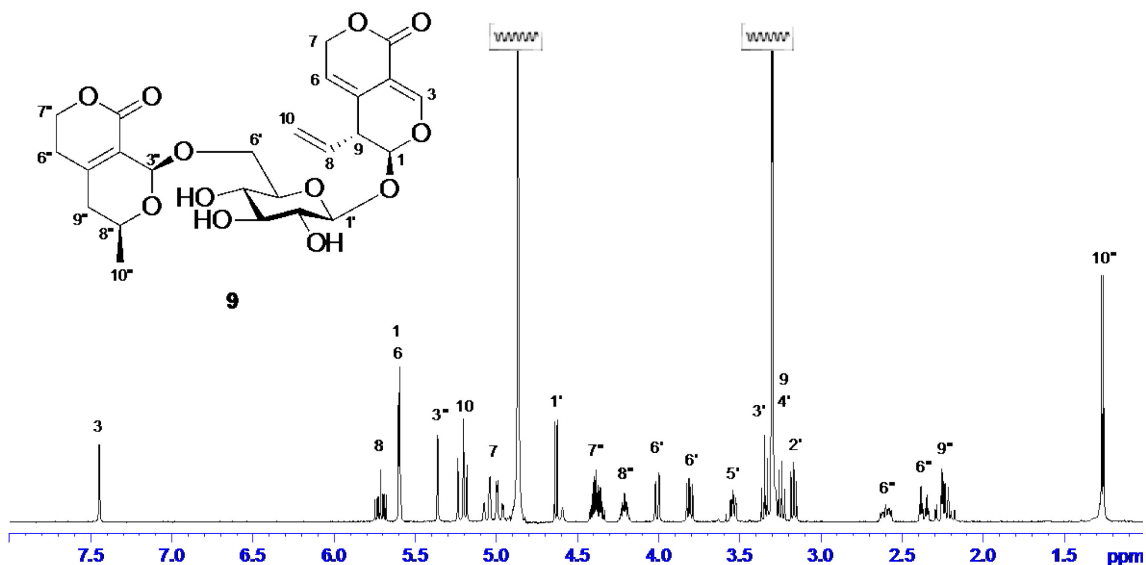


Figure 3.14.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide C (**9**) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

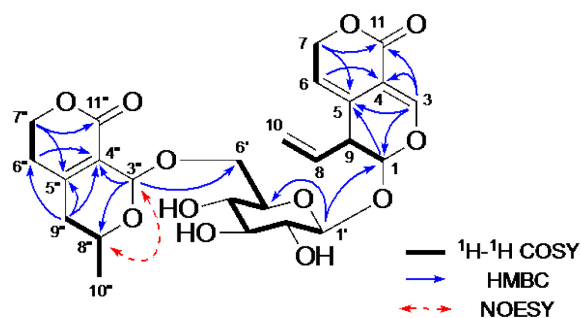


Figure 3.15. Selected 2D NMR correlations for rigenolides B (**8**) and C (**9**).

Rigenolide B (**8**)および C (**9**)を酸加水分解後、糖部分を UV 検出可能な thiocarbamoyl-thiazolidine 誘導体へと導き、その誘導体の HPLC 分析を行った。すなわち、**8** と **9** から得られた誘導体の保持時間が、同様に調整した D-グルコースの誘導体の保持時間 ( $t_{\text{R}}$  17.5 min) と一致したことから、**8** および **9** の糖をいずれも D-グルコースと同定した [92]。また、**8** および **9** のグルコースの結合様式はアノメリックプロトンの結合定数からいずれも  $\beta$  と帰属した。

セコイリドイド部分 (C-1–C-11)の相対配置は  $^3J_{\text{H-1}/\text{H-9}}$  の比較により帰属した。すなわち、rigenolide B (**8**)および C (**9**)の  $^3J_{\text{H-1}/\text{H-9}}$  がいずれも 3.1 Hz と gentiopicroside と同様の結合定数 ( $J = 3.0$  Hz) [72]を示したことから、H-1/H-9-*anti* と帰属した。以上の結果、rigenolide B (**8**)および C (**9**)はセコイリドイド部分とノレイリドイド部分(C-3''–C-11'')の立体配置が異なる、Fig. 3.16 に示す 4 種のジアステレオマーのいずれかであると推定した。

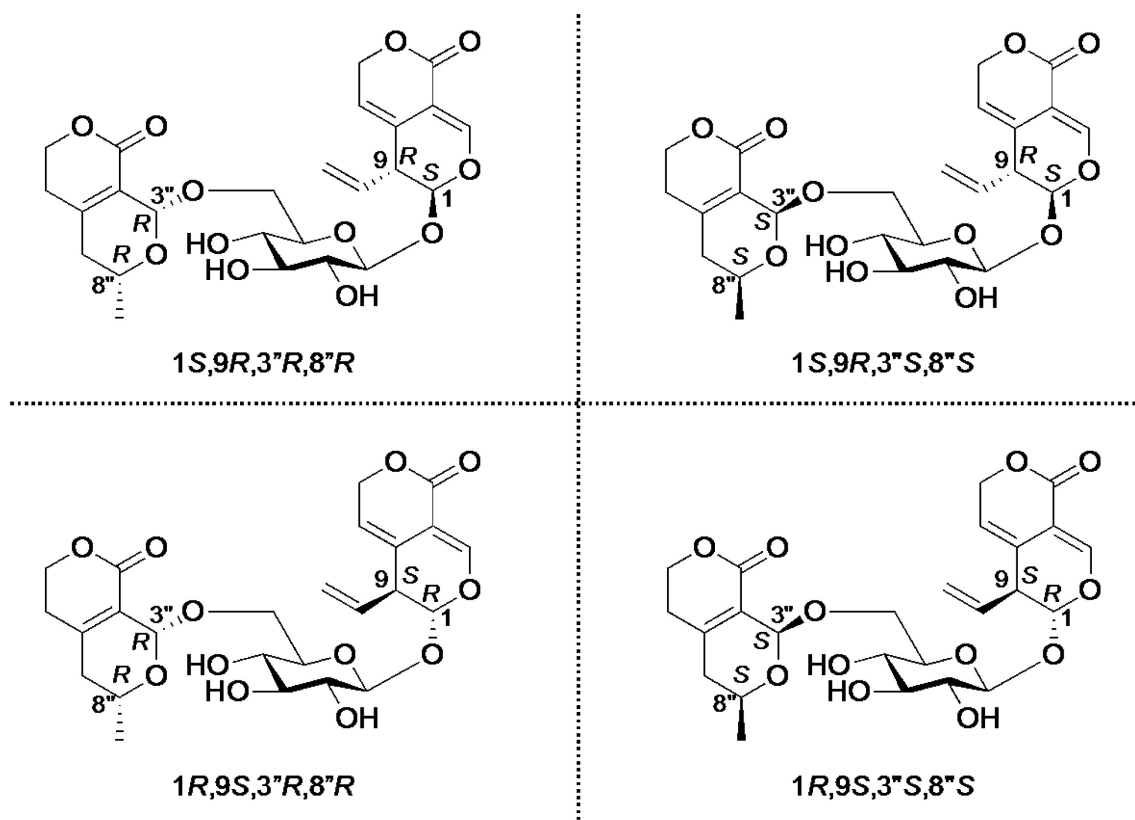
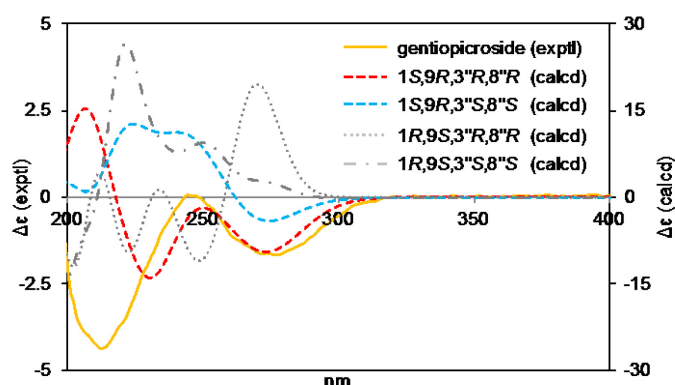


Figure 3.16. Possible diastereomers of rigenolides B (8) and C (9).

Rigenolide B (8)およびC (9)はセコイリドイド部分に共役ジエノン，ノルイリドイド部分にエノンといった Cotton 効果を示すことが期待される発色団を有する化合物である．分子全体はフレキシブルな構造を有しているが，セコイリドイド部分およびノルイリドイド部分それぞれはリジッドな構造であり，かつそれらがグルコースを挟んで空間的に離れている．加えて，絶対立体配置が明らかになっている gentiopicroside を単離していることから，ECD スペクトルの比較による絶対立体配置の帰属を試みた．

まず，Fig. 3.16 に示した 4 種のジアステレオマーの ECD スペクトルを計算化学的手法を用いて算出した．得られた計算値を比較したところ，1S,9R の配置を有するもの

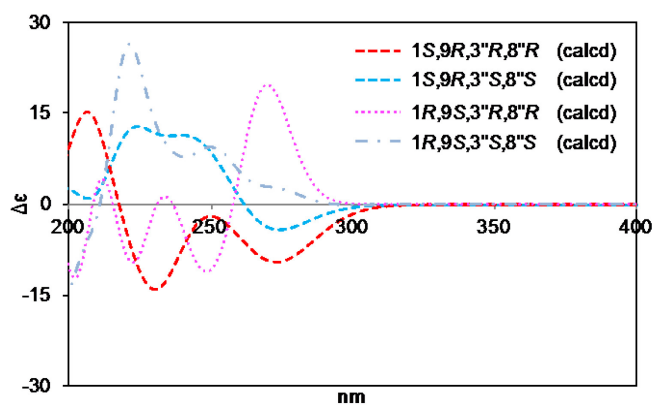
(1S,9R,3"S,8"S および 1S,9R,3"R,8"R) は 270 nm 付近のコットンの符号が共通して負であり，逆の配置の 1R,9S 配置のもの (1R,9S,3"S,8"S および 1R,9S,3"R,8"R) は正の Cotton 効果を示した．したがって 270nm 付近の Cotton 効果の符号はセコイリドイド部分の立体化学を反映する事が示唆された．このことは gentiopicroside の ECD スペクトルで 277 nm で負の Cotton 効果が観測されたことから支持された (Fig. 3.17)．



**Figure 3.17.** Experimental ECD spectrum of gentiopicroside and calculated ECD spectra of possible diastereomers of rigenolides B (**8**) and C (**9**).

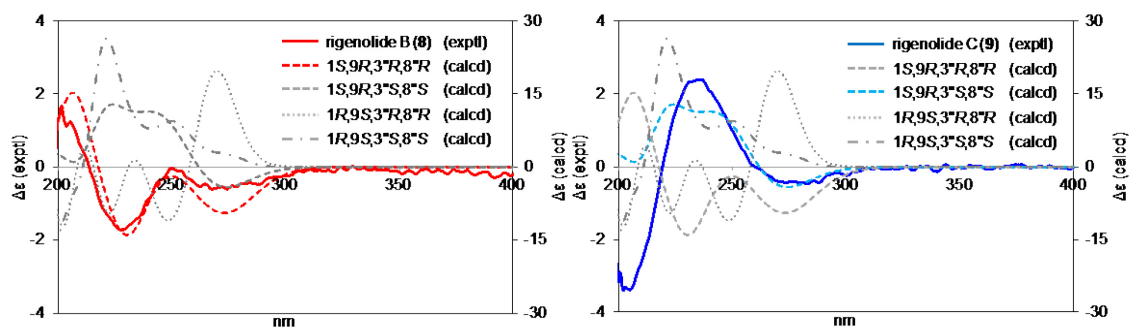
Rigenolide B (**8**)および C (**9**)の ECD スペクトルの実測値はそれぞれ 278 nm, 273 nm で負の Cotton 効果を示したことから(Fig. 3.18), セコイリドイド部分の絶対立体配置をいずれも 1*S*,9*R* と帰属した.

一方, ノルイリドイド部分の立体配置が 3'*S*,8'*S* の ECD スペクトルの計算値は 230 nm 付近で正の Cotton 効果を, 3'*R*,8'*R* のものは負の Cotton 効果を示した. したがって, ノルイリドイド部分の立体は 230 nm 付近の Cotton 効果に反映されると推定した.

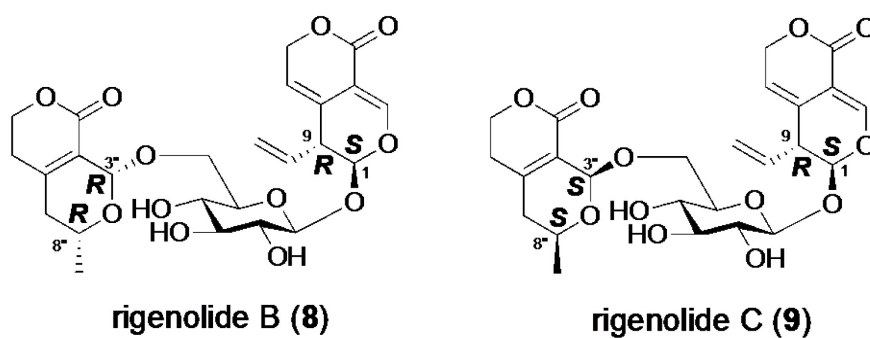


**Figure 3.18.** Calculated ECD spectra of possible diastereomer of rigenolide B (**8**) and C (**9**).

Rigenolide B (**8**)の ECD スペクトルの実測値は 230 nm 付近で正の Cotton 効果を, rigenolide C (**9**)は負の Cotton 効果を示したことから(Fig. 3.18), **8** のノルイリドイド部分の絶対立体配置を 3'*S*,8'*S*, **9** を 3'*R*,8'*R* と帰属した. 以上の結果から, rigenolide B (**8**)および C (**9**)の絶対立体配置を Fig. 3.20 に示す配置と結論した.



**Figure 3.19.** Experimental ECD spectrum of rigenolides B (8) and C (9) and calculated spectra of their possible diastereomers.



**Figure 3.20.** Structures of rigenolides B (8) and C (9).



**Table 3.3.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for rigenolides B (**22**) and C (**23**) in CD<sub>3</sub>OD.

Position	<b>8</b>		<b>9</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5.62 (1H, d, 3.1)	98.8	5.60 (1H, d, 3.1)	98.9
3	7.44 (1H, d, 1.1)	150.7	7.45 (1H, d, 1.1)	150.9
4	–	104.9	–	104.8
5	–	127.1	–	127.2
6	5.60 (1H, m)	117.2	5.59 (1H, m)	117.0
7	5.06 (1H, dd, 17.7, 1.3)	70.9	5.06 (1H, dd, 17.7, 1.3)	70.9
	4.98 (1H, dd, 17.7, 3.5)		4.98 (1H, dd, 17.7, 3.5)	
8	5.74 (1H, ddd, 17.2, 10.2, 6.9)	135.0	5.71 (1H, ddd, 17.4, 10.4, 6.9)	135.0
9	3.28 (1H, m)	46.7	3.28 (1H, m)	46.7
10	5.20 (1H, ddd, 17.2, 1.3, 1.3)	118.5	5.22 (1H, ddd, 17.4, 1.3, 1.3)	118.6
	5.18 (1H, ddd, 10.2, 1.3, 1.3)		5.19 (1H, ddd, 10.4, 1.3, 1.3)	
11	–	166.3	–	166.3
1'	4.63 (1H, d, 8.0)	100.5	4.63 (1H, d, 8.0)	100.6
2'	3.14 (1H, dd, 9.0, 8.0)	74.5	3.17 (1H, dd, 9.0, 8.0)	74.5
3'	3.34 (1H, dd, 9.0, 9.0)	77.9	3.35 (1H, dd, 9.0, 9.0)	78.2
4'	3.27 (1H, m)	71.5	3.24 (1H, dd, 9.0, 9.0)	71.9
5'	3.48 (ddd, 9.0, 6.5, 1.7)	77.7	3.54 (1H, ddd, 9.0, 6.8, 1.9)	76.6
6'	4.05 (1H, dd, 11.7, 1.7)	68.6	4.01 (1H, dd, 11.5, 1.9)	68.6
	3.77 (1H, dd, 11.7, 6.5)		3.81 (1H, dd, 11.5, 6.8)	
3"	5.39 (1H, s)	95.0	5.36 (1H, s)	93.9
4"	–	123.7	–	123.7
5"	–	157.1	–	156.8
6"	2.59 (1H, ddd, 18.0, 9.7, 6.0)	29.3	2.60 (1H, ddd, 17.0, 10.0, 6.0)	29.3
	2.39 (1H, ddd, 18.0, 4.8, 4.8)		2.36 (1H, ddd, 17.0, 4.6, 4.6)	
7"	4.38 (2H, m)	67.0	4.38 (2H, m)	66.9
8"	4.20 (1H, m)	63.0	4.21 (1H, m)	63.2
9"	2.29 (1H, dd, 19.0, 3.9)	37.5	2.27 (1H, dd, 18.9, 4.1)	37.5
	2.21 (1H, dd, 19.0, 10.6)		2.21 (1H, dd, 18.9, 10.3)	
10"	1.27 (d, 6.3)	21.0	1.26 (1H, d, 6.3)	21.0
11"	–	165.0	–	165.0

#### 第4項 Rigenolide D (10)および E (11)の構造解析

Rigenolide D (10)は無色非晶性固体として得られ, HRESIMS より分子式を  $C_{10}H_{14}O_4$  と帰属した.  $^1H$ NMR スペクトルでは, 1個のオレフィニックプロトン, 3個のオキシメチレン, 1個の  $sp^3$ メチレンおよび1個の *sec*-メチルに帰属されるシグナルが観測された (Table 3.4).  $^{13}C$  NMR では1個の $\alpha,\beta$ -不飽和カルボキシ基, 2個のオレフィンの存在が示唆された.

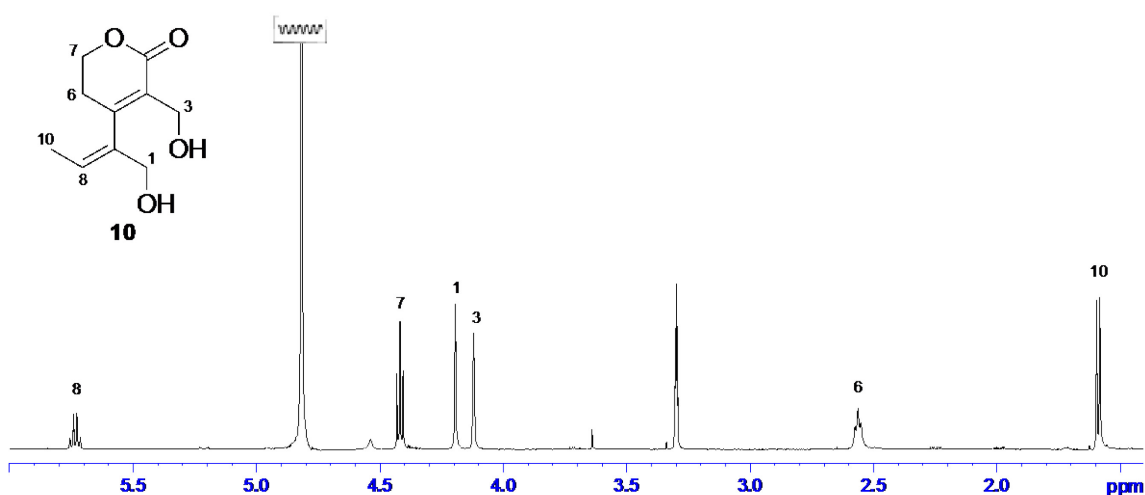
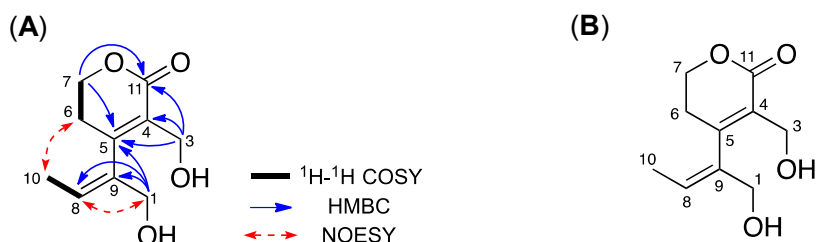


Figure 3.21.  $^1H$  NMR spectrum of rigenolide D (10) in  $CD_3OD$  (500 MHz).

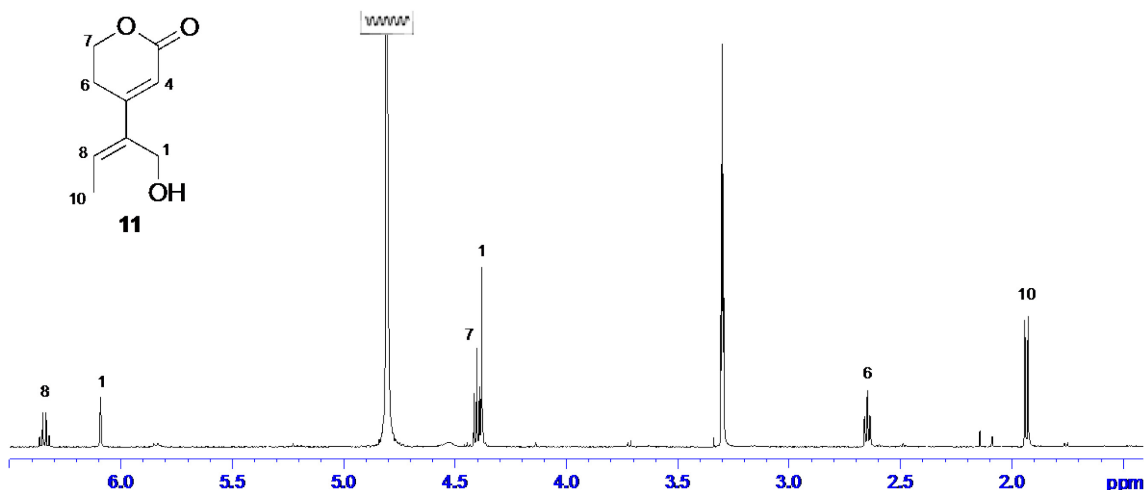
2D NMR スペクトルの解析により, rigenolide D (10)の平面構造を明らかにした. すなわち,  $H_2-6$  と  $H_2-7$  間の  $^1H-^1H$  COSY 相関,  $H_2-3$  と C-4, C-5, および C-11 間,  $H_2-7$  と C-5 および C-11 間の HMBC 相関から,  $\alpha$ -ヒドロキシメチル $\alpha,\beta$ -不飽和 $\delta$ -ラクトン部分(C-3-C-7 and C-11)の存在を明らかにした. さらに詳細な HMBC スペクトルの解析から, 三置換オレフィン(C-1 and C-8-C-10)が $\delta$ -ラクトンの $\beta$ 位 (C-5)に結合していると帰属した. また, deuterium-induced differential isotope shifts [93]によりヒドロキシ基の結合位置を確認した. すなわち,  $CD_3OH$  を用いて測定した  $^{13}C$  NMR スペクトルを測定したところ, C-1 および C-3 のケミカルシフトがそれぞれ 0.11 ppm 低磁場シフトして観測されたことから, C-1 と C-3 にヒドロキシ基が結合することが明らかとなった.

NOESY スペクトルにおいて,  $H_2-6$  と  $H_3-10$  間,  $H_2-1$  と H-8 間に NOE 相関が観測されたことより, C-8 の二重結合のジオメトリーを *E* と帰属した. したがって, rigenolide D (8)の構造を Fig. 3.22 に示す構造と結論した.



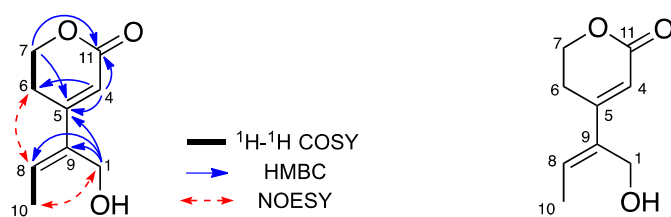
**Figure 3.22.** (A) Selected 2D NMR correlations for rigenolide D (**10**) and (B) structure of rigenolide D (**10**).

HRESIMS の解析から, rigenolide E (**11**)の分子式を  $C_9H_{12}O_3$   $\{m/z$  191.0688  $[M+Na]^+$ , calcd for  $C_9H_{12}O_3Na$ , 191.0684 $\}$  と帰属した.  $^1H$  NMR スペクトルは rigenolide D (**10**)のそれとよく類似していたが, **10** で観察された 2 個のヒドロキシメチル基に由来するシグナルが 1 つ消失し,  $sp^2$  メチンに由来するシグナルが新たに観測された.



**Figure 3.23.**  $^1H$  NMR spectrum of rigenolide E (**11**) in  $CD_3OD$  (500MHz).

H-4 と C-5, C-11, および C-6 間の HMBC 相関からも  $sp^2$  メチン(CH-4)の存在が支持された. さらに, **7** と比較して C-1 および C-8 のケミカルシフト値が異なっていたことから C-8 の二重結合のジオメトリーが異なる化合物であると推定した. NOESY スペクトルにおいて H-8 と H<sub>2</sub>-6, H<sub>2</sub>-1 と H<sub>3</sub>-10 間に NOE 相関が観測されたことから, C-8 二重結合のジオメトリーを *Z* と帰属し, rigenolide E (**11**)の構造を Fig. 3.24 に示す構造と帰属した.



**Figure 3.24.** (A) Selected 2D NMR correlations for rigenolide E (**11**) and (B) structure of rigenolide E (**11**).

**Table 3.4.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for rigenolides D (**10**) and E (**11**) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	<b>10</b>		<b>11</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	4.12 (2H, brs)	65.7	4.38 (2H, s)	56.6
3	4.19 (2H, s)	57.9		
4	–	129.2	6.09 (1H, br s)	114.1
5	–	155.8	–	158.1
6	2.56 (2H, t, 6.0)	29.9	2.65 (2H, td, 6.3, 0.9)	25.9
7	4.41 (2H, t, 6.0)	67.1	4.40 (2H, t, 6.3)	67.6
8	5.73 (1H, qt, 7.0, 1.0)	125.1	6.34 (1H, q, 7.2)	135.4
9	–	139.8	–	138.4
10	1.59 (3H, dt, 7.0, 1.0)	14.7	1.94 (3H, d, 7.2)	14.5
11	–	167.1	–	168.6

## 第 5 項 Acylated secoiridoid (12–14 および 17–19)の構造解析

Rigenolide F–H (12–14)および K–M (17–19)は、1D NMR スペクトルの解析からアシル化されたセコイリドイド配糖体であると推定した。これらはメタノリシスあるいはアセチル化により既知化合物へ誘導し、スペクトルデータを文献値と比較することで絶対配置を含めた構造を帰属した。以下構造解析の詳細について説明する。

Rigenolide K (17)は淡褐色非晶性固体として得られ、比旋光度 $-169.0$  ( $c$  0.93, MeOH)を示した。HRESIMS  $\{m/z$  515.1163  $[M+Na]^+$ , calcd for  $C_{23}H_{24}O_{12}Na$ , 515.1165 $\}$ より分子式を  $C_{23}H_{24}O_{12}$  と帰属した。17 の 1D NMR スペクトルは 1,2,3-三置換ベンゼンとエステルカルボニル炭素に由来するシグナルが観測されたことを除き gentiopicroside [72]のそれらとよく対応していたため、化合物 17 は gentiopicroside のアシル化体であると推定された。さらに H-2'が低磁場シフトして観測されたことから糖の 2 位にアシル基が結合していると推定した。

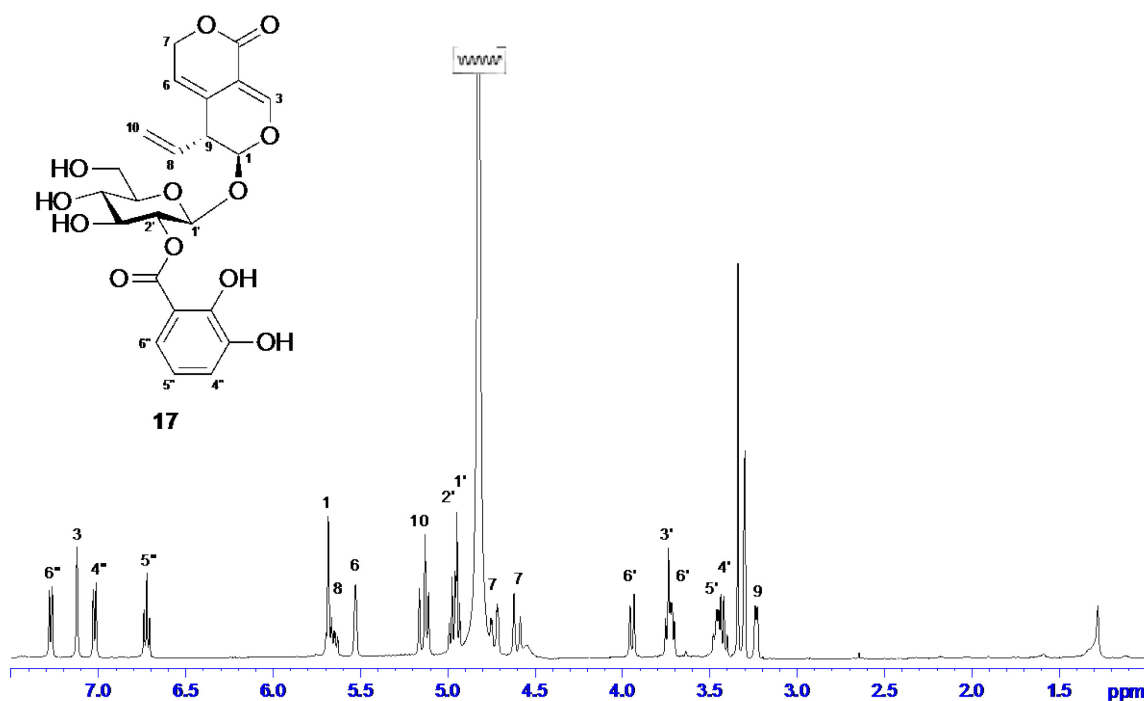
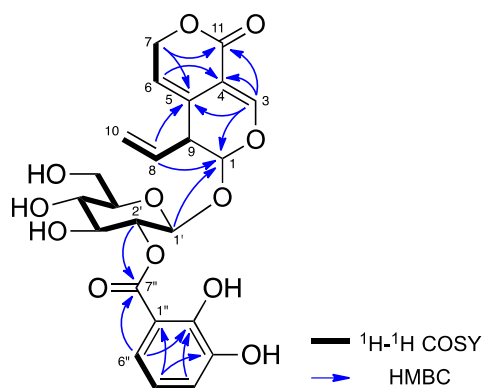
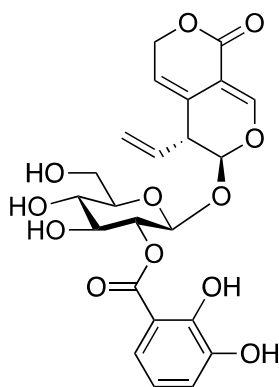


Figure 3.25.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide K (17) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).



**Figure 3.26.** Selected 2D NMR correlations for rigenolide K (**17**).

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにおいて Fig. 3.25 に示す相関が観察され、gentiopicroside に対応する部分構造の存在 (C-1-C-10 and C-1'-C-6')が確認された。 **17** に対し 0.05M NaOMe/MeOH によるメタノリシスを行ったところ、gentiopicroside [72]と methyl 2,3-dihydroxybenzoate [94]が得られた。グルコースの 2 位プロトン (H-2")と 7"位エステルカルボニル炭素間に HMBC 相関が見られたことから 2,3-dihydroxybenzoic acid はグルコースの 2 位に結合していることが判明し、 rigenolide K (**17**)の構造を Fig. 3.26 に示す構造と帰属した。



**Figure 3.27.** Structure of rigenolide K (**17**).

Rigenolide L (**18**)および H (**14**)は光学活性な非晶性固体として得られた  $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} -71.7 (c 0.19, \text{MeOH}) \text{ for } \mathbf{18}; [\alpha]_{\text{D}}^{18} -76.1 (c 0.12, \text{MeOH}) \text{ for } \mathbf{12}\}$ . HRESIMS より分子式はそれぞれ  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$  および  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$  と帰属した  $\{m/z 533.1271 [\text{M}+\text{Na}]^+, \text{calcd for } \text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_{13}\text{Na}, 533.1271 \text{ for } \mathbf{18}; m/z 575.1357 [\text{M}+\text{Na}]^+, \text{calcd for } \text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_{14}\text{Na}, 575.1377 \text{ for } \mathbf{14}\}$ .

Rigenolide L (**18**)および H (**14**)の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは **17** のそれらとよく類似しており、セコイリド配糖体に 2,3-dihydroxybenzoic acid が結合した化合物であると推定した。また、 rigenolide H (**12**)ではアセチル基に帰属されるシグナルも加えて観測された。さらに、 **17** で見られた 5 位、 6 位間の三置換オレフィンに帰属されるシグナルの代わりに 1

個のメチレン [ $\delta_{\text{H}}$  1.76 (1H, ddd,  $J = 14.0, 11.0, 5.0$  Hz), 1.69 (1H, ddd,  $J = 14.0, 3.0, 1.5$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  35.5 for **18**;  $\delta_{\text{H}}$  1.77 (1H, td,  $J = 12.0, 4.9$ ), 1.69 (1H, m),  $\delta_{\text{C}}$  33.5 for **14**] と酸素原子が結合した1個の三級炭素 [ $\delta_{\text{C}}$  each 64.3 for **18** and **14**]に由来するシグナルが観測されたことから, **18** および **14** は, **17** とセコイリドイド配糖体部分の異なる化合物と推定した.

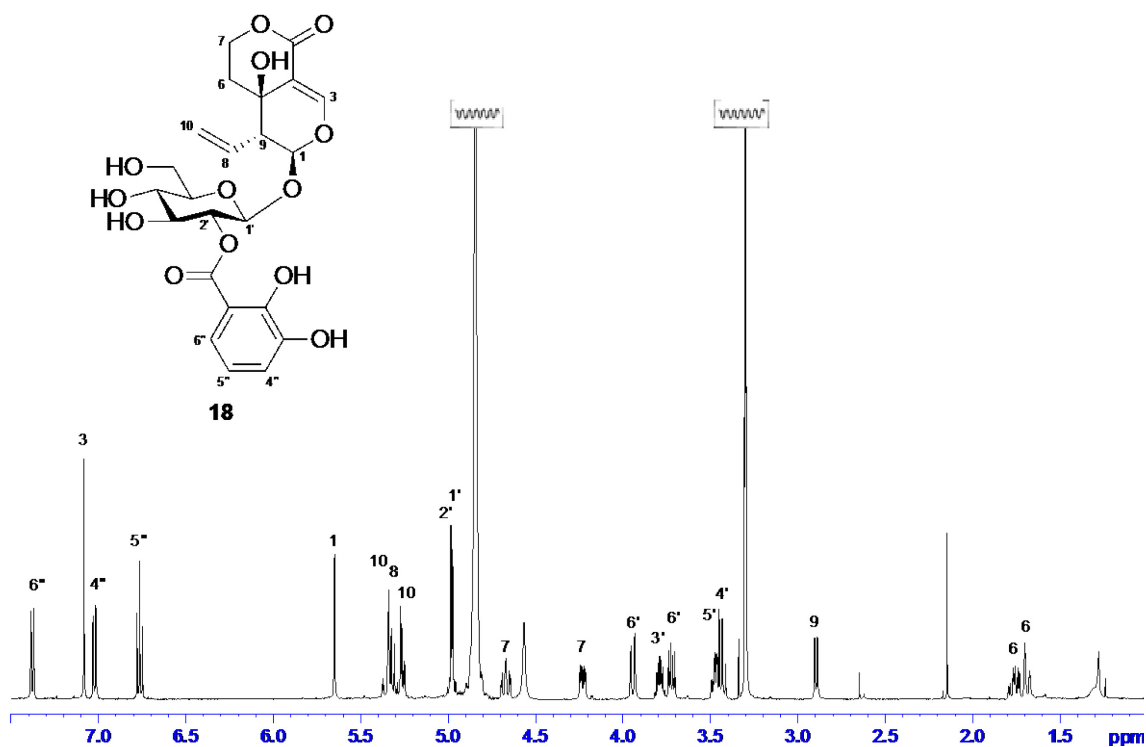


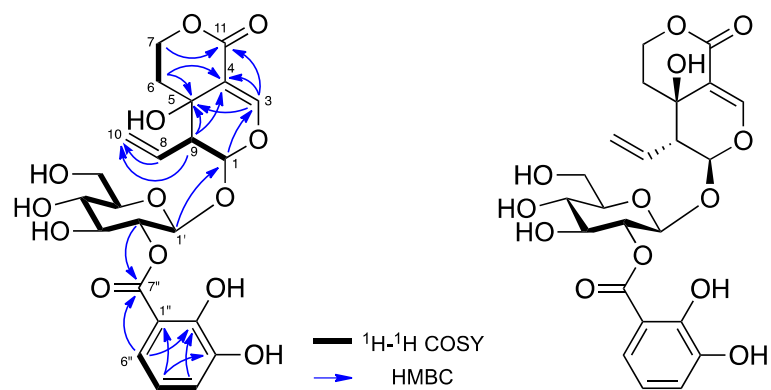
Figure 3.28.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide L (**18**) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500MHz).

**18** について 0.05M NaOMe/MeOH によるメタノリシスを行ったところ, swertiamarin [80] および methyl 2,3-dihydroxybenzoate [94] が得られたことから, **18** は swertiamirin に 2,3-dihydroxybenzoic acid が結合した化合物であることが明らかとなった.

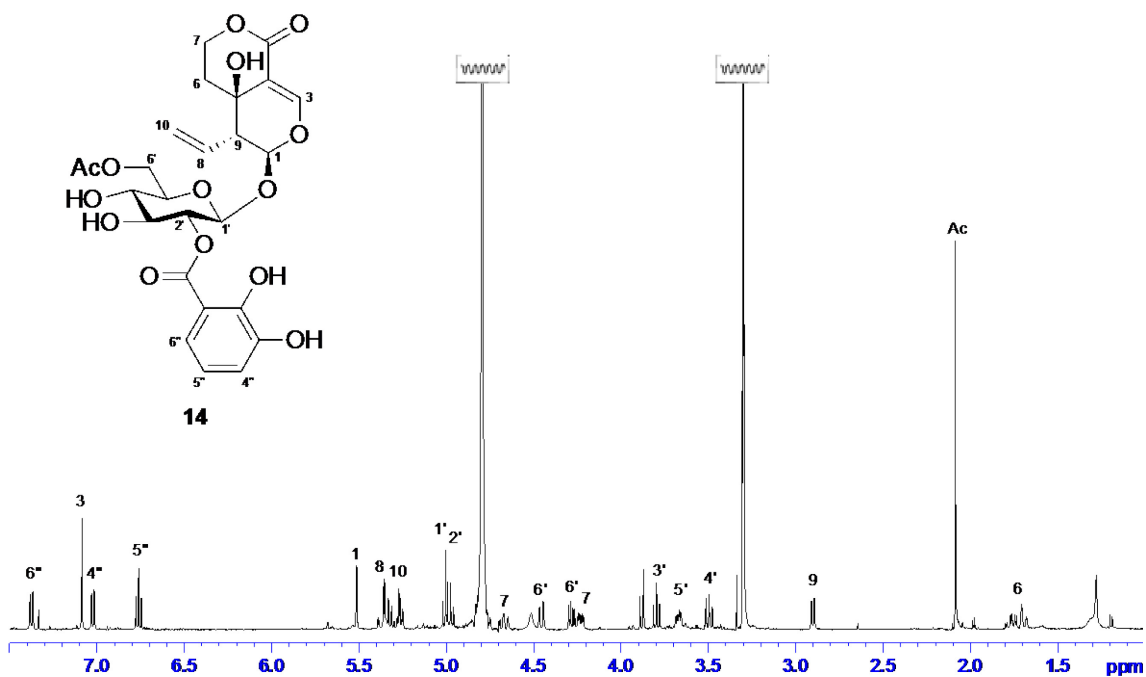
2,3-Dihydroxybenzoic acid の結合位置は, HMBC スペクトルにおける, グルコースの 2 位プロトンと 7'' 位エステルカルボニル炭素間の相関から **17** と同様に 2' 位であると結論した. 以上のことから, rigenolide L (**18**) の構造を Fig. 3.28 に示す構造と帰属した.

一方, **14** は  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC スペクトルにおいて **18** と同様の相関が認められ, H-6' とアセチル基に帰属されるエステルカルボニル炭素間に HMBC 相関が得られたことから, **18** の 6' 位にアセチル基が結合した構造と推定した.

Rigenolide H (**14**) をピリジン中, 無水酢酸を用いてアセチル化を行い得られた誘導体 (**14a**) の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよび比旋光度が, rigenolide L (**18**) をアセチル化して得られた誘導体 (**18a**) のそれらと一致した. 以上の結果から, rigenolide H (**14**) の構造を 6'-O-acetyl-2'-O-(2,3-dihydroxybenzoyl)-swertiamarin と結論した.



**Figure 3.29.** (A) Selected 2D NMR correlations for rigenolide L (**18**) and (B) structure of rigenolide L (**18**).



**Figure 3.30.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide H (**14**) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).



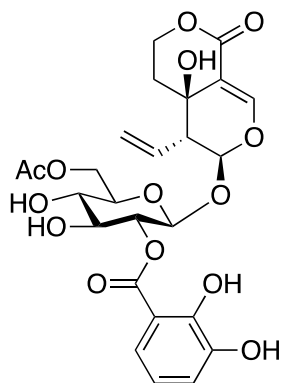


Figure 3.31. Structure of rigenolide H (**14**).

Rigenolide M (**19**)は淡褐色非晶性固体として得られ、比旋光度 $-184.7$  ( $c$  0.77, MeOH)を示した。HRESIMS  $\{m/z$  517.1323  $[M+Na]^+$ , calcd for  $C_{23}H_{26}O_{12}Na$ , 517.1322 $\}$ より **19** の分子式は **18** よりも酸素原子が 1 個少ない  $C_{23}H_{26}O_{12}$  と判明した。

$^1H$  および  $^{13}C$  NMR スペクトルは **18** のそれらとよく類似していたが、**18** で見られた酸素原子が結合した三級炭素に由来するシグナルが観測されず、1 個のメチン [ $\delta_H$  3.11 (1H, m);  $\delta_C$  28.4] に帰属されるシグナルが観測されたことから、**19** のセコイリドイド配糖体部分は sweroside [80,95] であると推定した。また、低磁場シフトした糖由来のプロトンが **18** と異なって観察されたことから、2,3-dihydroxybenzoic acid の結合位置が異なる化合物であると推定した。

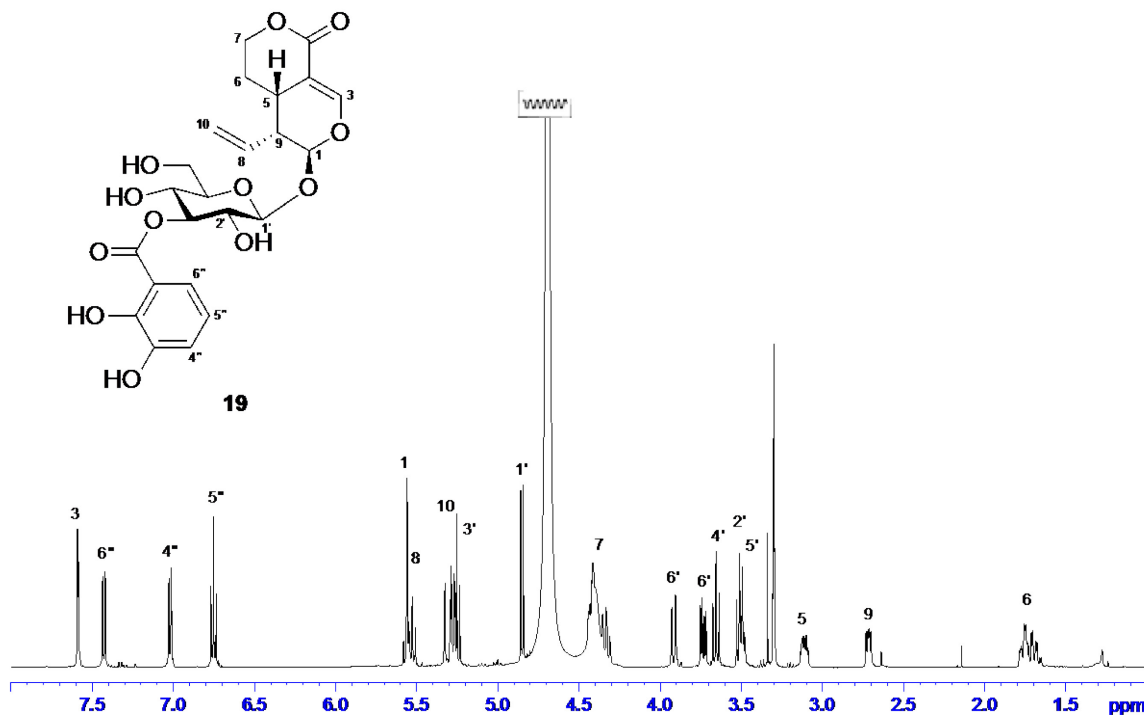
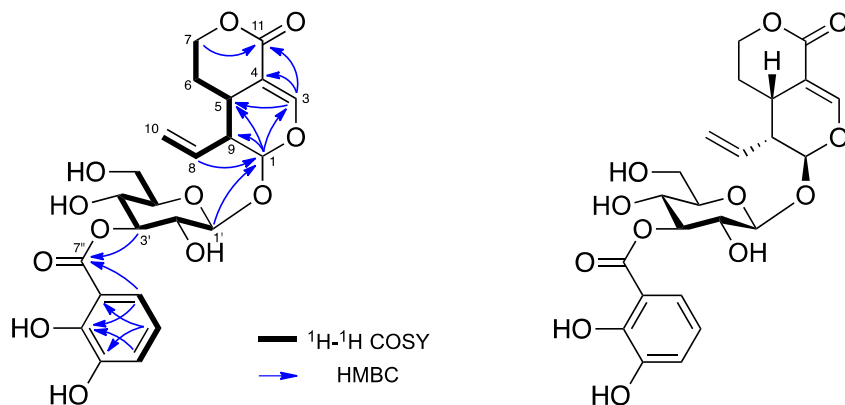


Figure 3.32.  $^1H$  NMR spectrum of rigenolide M (**19**) in  $CD_3OD$  (500 MHz).

Rigenolide M (**19**)のメタノリシスを行ったところ、sweroside [80,95]および methyl 2,3-dihydroxybenzoate [94]が得られた。HMBC スペクトルにおいて、グルコースの3位プロトンと7''位エステルカルボニル炭素間に相関が見られたことから、2,3-dihydroxybenzoic acid は3'位に結合していると結論した。以上のことから **19** の構造を Fig. 3.33 に示す構造と帰属した。



**Figure 3.33.** (A) Selected 2D NMR correlations for rigenolide M (**19**) and (B) structure of rigenolide M (**19**).

**Table 3.5.** <sup>1</sup>H NMR data for rigenolides H (**14**) and K–M (**17–19**) in CD<sub>3</sub>OD.

Position	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>19</b>
	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)
1	5.69 (1H, m)	5.65 (1H, d, 1.0)	5.51 (d, 1.5)	5.57 (1H, m)
3	7.12 (1H, s)	7.08 (1H, s)	7.09 (s)	7.60 (1H, d, 2.5)
5	-	-	-	3.11 (1H, m)
6	5.53 (1H, br s)	1.76 (1H, ddd, 14.0, 11.0, 5.0)	1.77 (td, 12.0, 4.9)	1.76 (1H, ddd, 13.0, 4.0, 2.0)
		1.69 (1H, ddd, 14.0, 3.0, 1.5)	1.69 (m)	1.69 (1H, ddd, 13.0, 12.0, 4.0)
7	4.73 (1H, dd, 17.5, 3.5)	4.67 (1H, ddd, 11.0, 11.0, 3.0)	4.67 (ddd, 12.0, 11.0, 2.6)	4.43 (1H, ddd, 12.0, 4.0, 2.0)
	4.60 (1H, d, 17.5)	4.23 (1H, ddd, 11.0, 5.0, 1.5)	4.23 (ddd, 11.0, 4.9, 1.6)	4.34 (1H, ddd, 12.0, 12.0, 2.0)
8	5.65 (1H, m)	5.32 (1H, m)	5.31 (m)	5.54 (1H, m)
9	3.23 (1H, br d, 6.0)	3.23 (1H, br d, 6.0)	2.90 (dd, 8.6, 1.5)	2.72 (1H, dd, 9.0, 5.5)
10	5.15 (1H, d, 16.5)	5.35 (1H, m)	5.37 (dd, 16.5, 2.8)	5.31 (1H, dd, 17.0, 1.5)
	5.12 (1H, d, 10.0)	5.26 (1H, d, 9.0)	5.26 (dd, 9.5, 2.8)	5.28 (1H, dd, 10.5, 1.5)
11	-	-	-	-
1'	4.94 (1H, d, 8.0)	4.94 (1H, m)	5.01 (d, 8.1)	4.85 (1H, d, 8.0)
2'	4.98 (1H, t, 8.0)	4.98 (1H, m)	4.98 (dd, 9.0, 8.1)	3.51 (1H, m)
3'	3.74 (1H, m)	3.79 (1H, m)	3.80 (t, 9.0)	5.26 (1H, t, 9.5)
4'	3.42 (1H, m)	3.44 (1H, m)	3.50 (dd, 9.8, 9.0)	3.65 (1H, t, 9.5)
5'	3.46 (1H, m)	3.47 (1H, ddd, 10.0, 6.0, 2.0)	3.67 (ddd, 9.8, 5.3, 2.1)	3.49 (1H, m)
6'	3.95 (1H, d, 11.5)	3.94 (1H, dd, 12.0, 2.0)	4.46 (dd, 12.0, 2.1)	3.92 (1H, dd, 11.5, 2.5)
	3.72 (1H, m)	3.72 (1H, dd, 12.0, 6.0)	4.28 (dd, 12.0, 5.3)	3.73 (1H, dd, 11.5, 6.0)
1''	-	-	-	-
2''	-	-	-	-
3''	-	-	-	-
4''	7.02 (1H, d, 8.0)	7.02 (1H, dd, 8.0, 1.5)	7.02 (1H, dd, 8.0, 1.5)	7.02 (1H, dd, 8.0, 1.5)
5''	6.72 (1H, t, 8.0)	6.76 (1H, t, 8.0)	6.76 (t, 8.0)	6.76 (1H, t, 8.0)
6''	7.27 (1H, d, 8.0)	7.38 (1H, dd, 8.0, 1.5)	7.38 (dd, 8.0, 1.5)	7.43 (1H, dd, 8.0, 1.5)
6'-Ac			2.09 (3H, s)	

**Table 3.6.** <sup>13</sup>C NMR data for rigenolides H (**14**) and K–M (**17–19**) in CD<sub>3</sub>OD.

Position	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>19</b>
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>C</sub>
1	97.3	99.9	100.0	98.1
3	149.1	153.5	153.4	154.0
4	104.9	109.3	109.4	105.5
5	126.4	64.3	64.3	28.4
6	117.9	35.5	33.5	25.9
7	70.3	65.6	65.7	69.7
8	134.7	133.2	133.2	133.2
9	46.0	51.9	51.9	43.8
10	118.2	121.5	121.5	121.0
11	165.4	166.9	166.8	168.5
1'	96.8	99.0	99.0	99.6
2'	75.2	75.7	75.6	72.9
3'	75.3	75.2	75.0	79.6
4'	71.8	71.5	71.3	69.5
5'	78.7	78.8	75.9	78.1
6'	62.6	62.5	64.2	62.3
1''	113.5	113.3	113.3	114.1
2''	151.3	151.8	151.7	151.4
3''	147.0	147.4	147.4	147.0
4''	122.2	122.4	122.4	121.8
5''	120.6	120.2	120.2	119.9
6''	121.0	121.1	121.1	121.4
7''	170.8	171.9	171.8	171.4
6'-Ac			172.7 20.7	

Rigenolide F (**12**)および G (**13**)はそれぞれ光学活性な無色非晶性固体として得られた $\{[\alpha]_D^{17} -178.0 (c 0.44, \text{MeOH}) \text{ for } \mathbf{12}; [\alpha]_D^{25} -162.3 (c 0.18, \text{MeOH}) \text{ for } \mathbf{13}\}$ . HRESIMS から, それぞれの分子式を  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$  および  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$  と帰属した $\{m/z 423.1261 [\text{M}+\text{Na}]^+ (\text{calcd for } \text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{10}\text{Na}, 423.1267) \text{ for } \mathbf{12}; m/z 465.1387 [\text{M}+\text{Na}]^+ (\text{calcd for } \text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{Na}, 465.1373) \text{ for } \mathbf{13}\}$ . 両者の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルは, rigenolide M (**19**)のそれとセコイリドイド部分についてよく類似したスペクトルを示し, **12** および **13** を sweroside 誘導体と推定した. しかし, **12** および **13** では 2,3-dihydroxybenzoic acid の代わりにアセチル基に帰属されるシグナルが観察されたことから, rigenolide F (**12**)および G (**13**)は sweroside のアセテートと推定した.

それぞれの化合物について pyridine 中, 無水酢酸を用いて処理し, アセチル化体 (**12a** および **13a**)を得た. 得られた誘導体は  $^1\text{H}$  NMR データおよび旋光度から tetraacetylsweroside [96]と同定した. HMBC スペクトルで, rigenolide F (**12**)における H-2'と $\delta_C 171.8$ 間, rigenolide G (**13**)における H-2' ( $\delta_H 4.68$ )と $\delta_C 171.8$ 間および H<sub>2</sub>-6' ( $\delta_H 4.42$  and  $4.22$ )と $\delta_C 172.7$ 間にそれぞれ相関が観察されたことから, C-2'および C-2', C-6'にアセチル基が結合すると帰属した. 以上のことから rigenolide F (**12**)および G (**13**)をそれぞれ 2'-O-acetylsweroside および 2',6'-di-O-acetylsweroside と結論した.

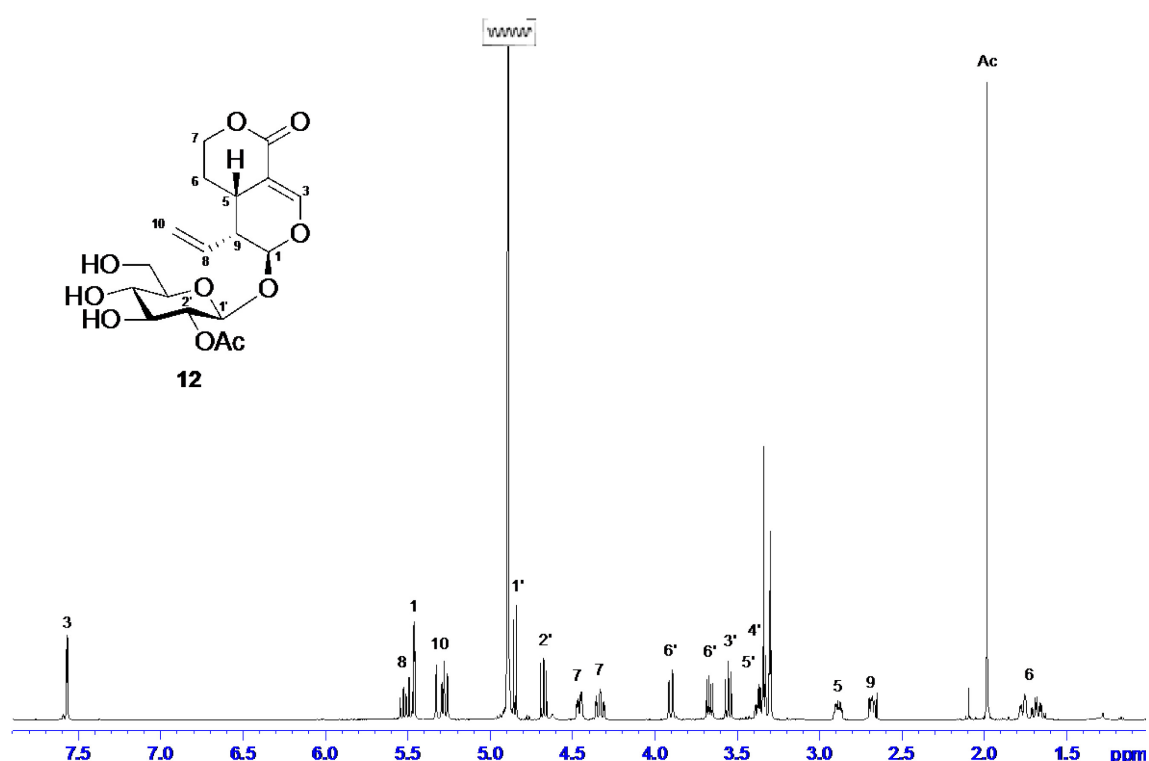


Figure 3.34.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rigenolide F (**12**) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

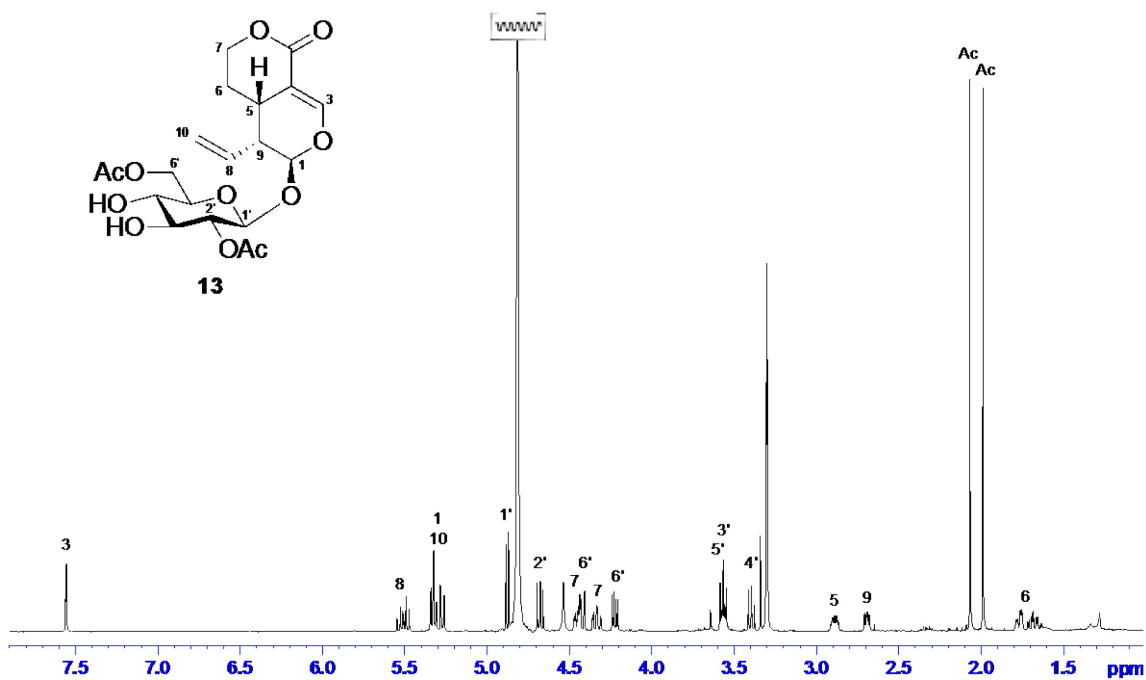


Figure 3.35. <sup>1</sup>H NMR spectrum of rigenolide G (13) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz).

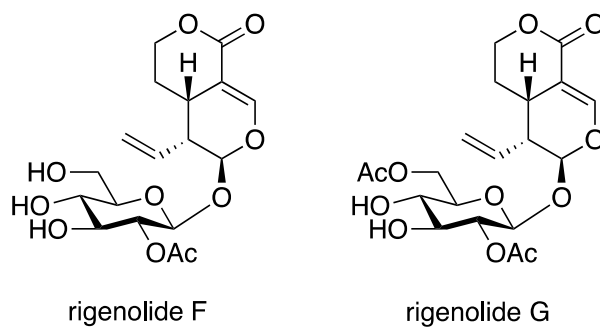


Figure 3.36. Structures of rigenolide F (12) and G (13).

**Table 3.7.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for rigenolides F (**12**) and G (**13**) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	<b>12</b>		<b>13</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5.46 (d, 2.0)	98.3	5.33 (d, 1.8)	98.5
3	7.57 (d, 2.5)	153.6	7.56 (d, 2.5)	153.5
4	–	106.5	–	106.6
5	2.88 (ddt, 13.0, 5.7, 2.5)	28.7	2.89 (ddt, 13.0, 5.6, 2.2)	28.7
6	1.77 (dq, 13.0, 2.5)	25.8	1.77 (dq, 13.0, 2.2)	25.8
	1.67 (qd, 13.0, 4.5)		1.67 (tdd, 13.0, 13.0, 4.3)	
7	4.45 (ddd, 11.0, 4.5, 2.5)	70.0	4.46 (ddd, 11.3, 4.3, 2.2)	70.0
	4.33 (ddd, 13.0, 11.0, 2.5)		4.33 (ddd, 13.0, 11.3, 2.2)	
8	5.51 (dt, 17.0, 10.0)	132.9	5.51 (dt, 17.1, 10.0)	132.9
9	2.68 (ddd, 10.0, 5.7, 2.0)	43.4	2.69 (ddd, 10.0, 5.6, 1.8)	43.5
10	5.31 (dd, 17.0, 2.0)	121.1	5.32 (dd, 17.1, 1.7)	121.2
	5.27 (dd, 10.0, 2.0)		5.27 (dd, 10.0, 1.7)	
11	–	168.1	–	168.1
1'	4.85 (d, 8.0)	97.7	4.88 (d, 8.1)	97.8
2'	4.68 (dd, 9.0, 8.0)	74.9	4.68 (dd, 9.4, 8.1)	74.7
3'	3.56 (t, 9.0)	75.5	3.56 (t, 9.4)	75.3
4'	3.35 (m)	71.5	3.39 (t, 9.4)	71.3
5'	3.37 (ddd, 9.0, 6.0, 2.0)	78.5	3.57 (m)	75.7
6'	3.90 (dd, 12.0, 2.0)	62.6	4.42 (dd, 12.0, 2.1)	64.4
	3.67 (dd, 12.0, 6.0)		4.22 (dd, 12.0, 5.4)	
2'-Ac	1.98 (3H, s)	171.8	1.99 (3H, s)	171.8
		21.0		21.0
6'-Ac			2.07 (3H, s)	172.7
				20.7

#### 第4節 生物活性

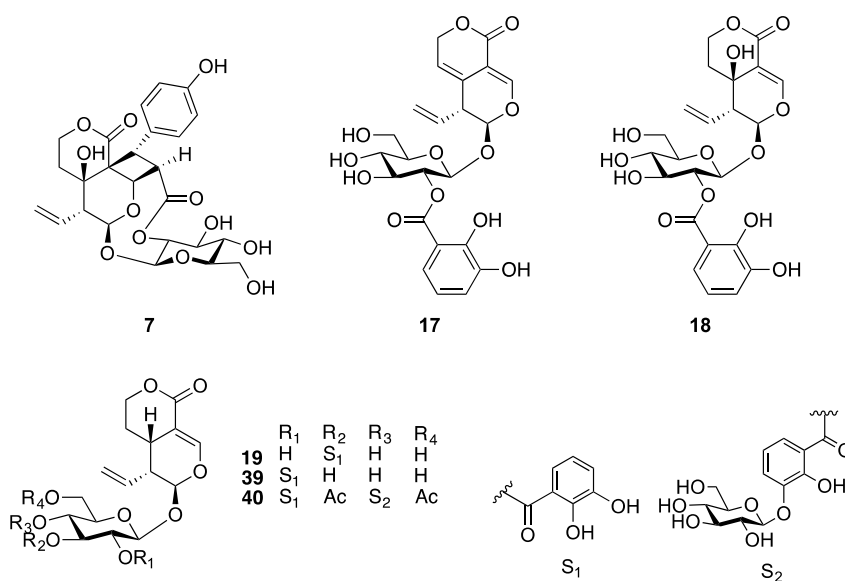
単離した新規化合物4種(7, 17-19)と既知化合物2種(39, 40)について DPPH ラジカル消去活性を測定した。

Rigenolide A(7)を除く全ての化合物に DPPH ラジカル消去活性が見られた。特に 40 は IC<sub>50</sub> 値 16.2±0.3 μM と, positive control である ascorbic acid より強いラジカル消去活性を示した。

*p*-Hydroxybenzoic acid など, 構造中にフェノール性水酸基を1つしか有していないものに比べ, protocatechuic acid や gallic acid といったポリフェノール類は強いラジカル消去活性を示すことが報告されている [97-100]。Rigenolide L-M (17-18), 2'-(2,3-dihydroxybenzoyl)-sweroside (39), および macrophyllside A (40) の DPPH ラジカル消去にはカテコール構造が主に関与していると推定された。

**Table 3.8.** DPPH radical scavenging activity (IC<sub>50</sub> in μM) of compounds 7, 17-19, 38-39.

Compound	IC <sub>50</sub> ± SE
Rigenolide A (7)	>100
Rigenolide K (17)	48.2 ± 1.2
Rigenolide L (18)	36.7 ± 2.4
Rigenolide M (19)	36.4 ± 1.1
2'-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-sweroside (39)	44.6 ± 0.8
Macrophyllside A (40)	16.2 ± 0.3
L-Ascorbic acid	30.1 ± 0.3



**Figure 3.37.** Compounds evaluated their DPPH radical scavenging activities.



## 第5節 小括

2008年に雲南省にて購入したリンドウ科植物 *Gentiana rigescens* の成分研究を行い、地上部の MeOH エキスから、8 種の新規化合物を含む 27 種の化合物を、根および根茎の MeOH エキスから、5 種の新規化合物を含む 10 種の化合物を単離した。単離した化合物の構造を各種スペクトルデータの詳細な解析、ECD 計算により帰属した (Fig. 3.38)。

Rigenolide A (**7**)はセコイリドイド配糖体の糖部に結合した *p*-クマロイル基がセコイリドイド部分と [2+2] 環化付加反応により生成した化合物で、分子内に四員環と九員環を有する非常に珍しい構造を有している。

Rigenolide I (**15**)と J (**16**)はセコイリドイド配糖体から生成すると考えられるノルイリドイドであり、rigenolide B (**8**) および C (**9**) は、セコイリドイドと **15** がグルコースを介して結合した、特異な化学構造を有する化合物である。

ノルイリドイドの中でも、**15** や **16** のようなセコイリドイド型のもの単離報告が少なく、新規性の高い化合物である。

今回、アシル化されたセコイリドイド配糖体、特に 2,3-dihydroxybenzoic acid が結合したものが数多く含有されていた。過去の報告でも、*Gentiana* 属植物からは種々の 2,3-dihydroxybenzoic acid 誘導体が単離されている。一方で、他のリンドウ科植物からは 2,3-dihydroxybenzoic acid 誘導体の単離報告はなく、本属に特有の化合物群であると考えられる。

また、今回の研究で単離したイリドイドはセコイリドイド型の種類が多く、イリドイド型は loganic acid のみであった。他の *Gentiana* 属植物からは種々のイリドイド型化合物が単離されているが、*G. rigescens* からは loganic acid およびその誘導体しか単離報告がなく、本植物に含有されるイリドイドはセコイリドイド型が主であると考えられる。

一方、本研究により、*G. rigescens* 地上部に種々のイリドイドが含有されていることが明らかとなった。しかしながら、生薬リュウタンは根および根茎を薬用部位としており、地上部は使用されていない。これは、生薬リュウタンの主要薬効成分とされている gentiopicroside の含量が地上部で少なく、LC-MS/MS による定量で中国薬典に規定されている 1.5%に満たない [101]ことに起因すると考えられる。

単離した新規化合物 4 種 (**7**, **17-19**) と既知化合物 2 種 (**39**, **40**) について DPPH radical scavenging assay を行った。**7**以外の化合物に DPPH ラジカル消去活性が見られ、特に **40** は positive control の L-ascorbic acid よりも強いラジカル消去活性を示した。

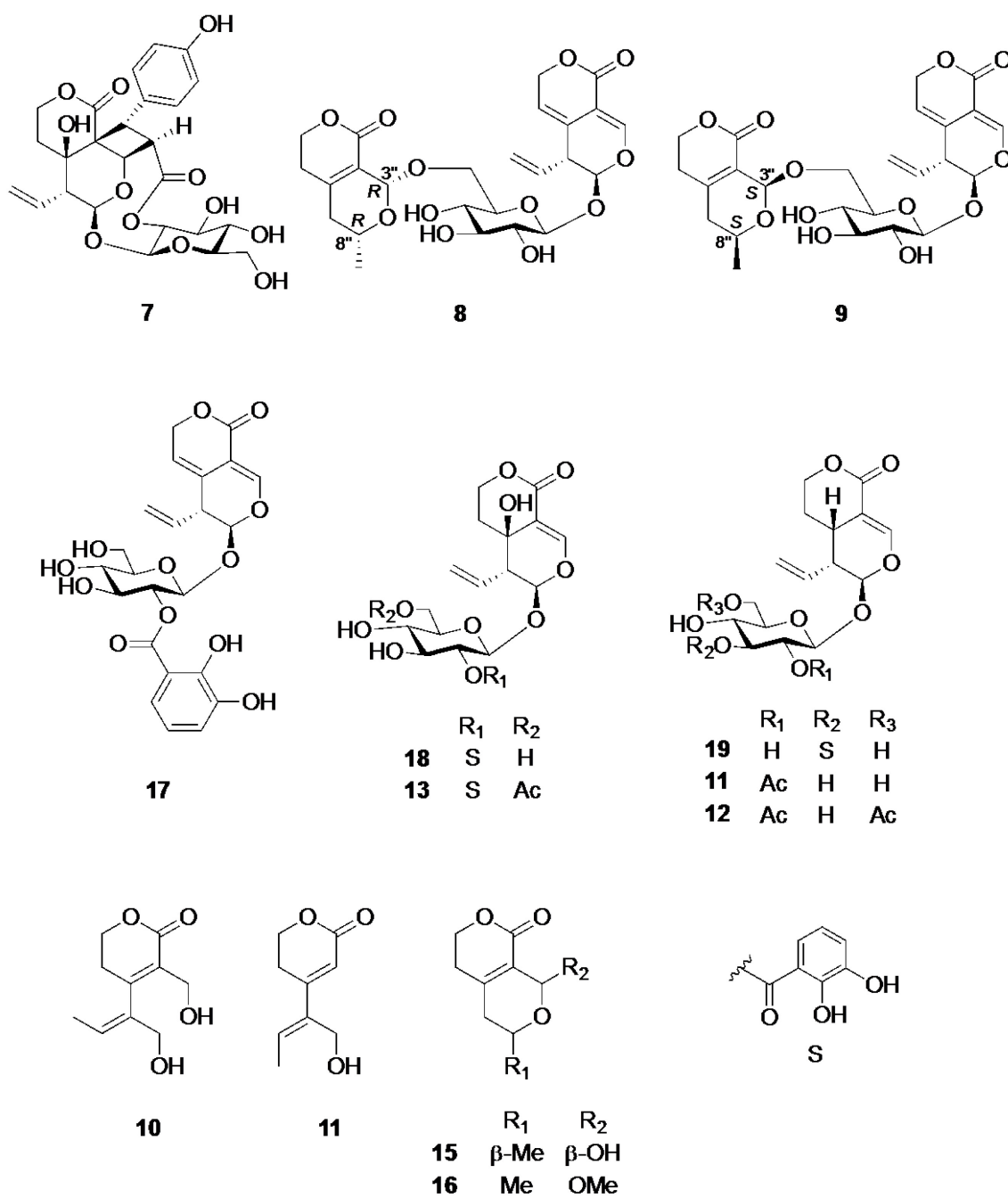


Figure 3.38. New compounds isolated from *G. rigescens*.

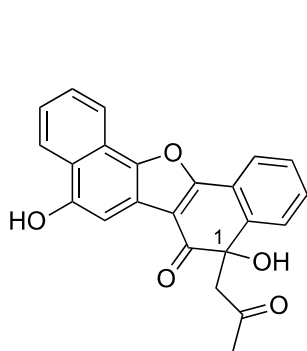
## 結語

著者は医薬品リード探索および新規化合物探索を目的に、雲南省にて少数民族のイ族が根を鼻血や月経過多の治療に用いているアカネ科植物 *Ribia yunnanensis* および同じくイ族が根を肝炎や胆嚢炎の治療に用いている *Gentiana rigescens* の成分研究を行った。

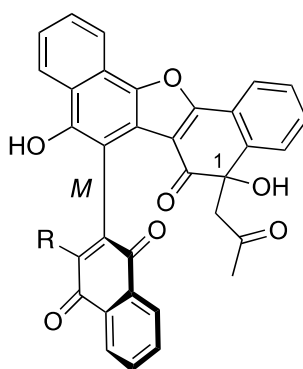
雲南省産 *R. yunnanensis* の根より 5 種の新規ナフトキノン誘導体 rubiaquinone A-E (**1-5**) を単離した。

Rubiaquinone A (**1**) は 1,4-dihydroxynaphthalene および 4-hydroxy-1,2-naphthoquinone からなるナフトキノン二量体である。ラセミ体であったため光学分割を行い、得られたエナンチオマーの ECD スペクトルの実測値を TDDFT により算出した計算値と比較する事で絶対立体配置を明らかにした。また、**1** は *Bacillus subtilis* に対する抗菌活性を示した。

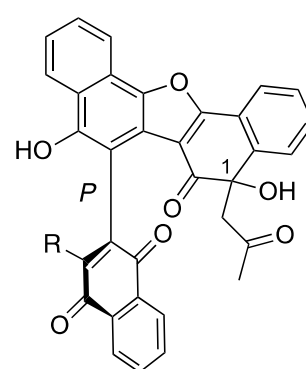
Rubiaquinone B-E (**2-5**) は分子内に 1 つの不斉軸ならびに 1 つの不斉炭素をもつ、ユニークなナフトキノン三量体であった。**2** および **3** は **1** と同様の解析による立体配置の帰属が困難であったため、ECD スペクトルを足し合わせる事で複雑な Cotton 効果を単純化する加算スペクトルによる解析を考案した。加算スペクトルを用いて rubiaquinone B (**2**) および C (**3**) 不斉炭素あるいは不斉軸に由来する Cotton 効果のみを抽出し、エナンチオマーの絶対立体配置を明らかにした。この加算スペクトルは、複数の不斉中心あるいは不斉軸を有し、ECD スペクトルの比較による解析が困難な化合物に適応できる可能性がある。



(+)-**1** : 1*R*  
(-)-**1** : 1*S*



(+)-**2** : 1*S*, R = OH  
(+)-**3** : 1*R*, R = OH  
(-)-**4** : 1*S*, R = CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>  
(-)-**5** : 1*R*, R = CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>



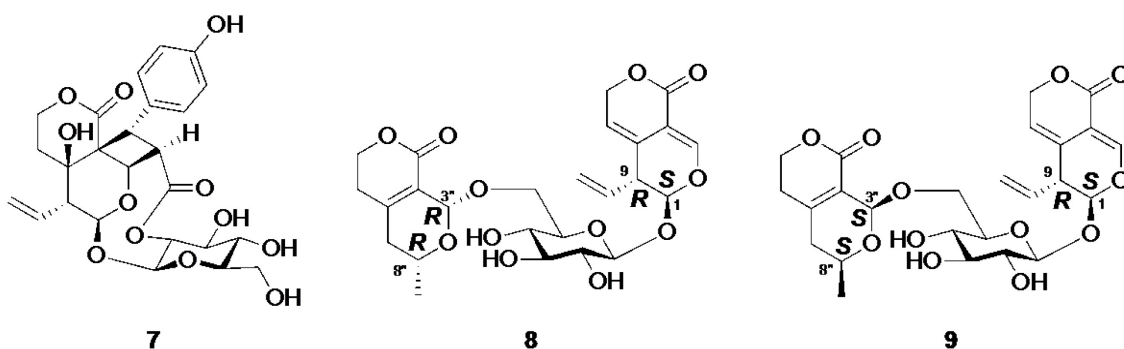
(-)-**2** : 1*R*, R = OH  
(-)-**3** : 1*S*, R = OH  
(+)-**4** : 1*R*, R = CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>  
(+)-**5** : 1*S*, R = CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>

雲南省にて購入した *G. rigescens* の地上部ならびに根および根茎から 13 種の新規イリドイドを含む 36 種の化合物を単離した。

Rigenolide A (7) は分子内に四員環と九員環を有する非常に珍しい構造の化合物である。NOESY スペクトルの解析, および糖の同定を行い, 絶対立体配置を明らかにした。

Rigenolide I (15) と J (16) はセコイリドイド配糖体から生成すると考えられるノルイリドイドであり, rigenolide B (8) および C (9) は, それぞれ 2 個の不斉炭素を含むノルイリドイド部分とセコイリドイド部分を有する化合物である。それらの部分構造がグルコースにより隔てられていたこと, さらに分子が高い自由度をもつことから NMR による相対配置の帰属が困難であったが, 糖分析と ECD スペクトルの詳細な解析を行うことで絶対立体配置を含めた化学構造を明らかにした。

単離した化合物のうち, 40 について強いラジカル消去活性を見出した。



## 謝辞

本研究を行うにあたり，多大なる御指導・御鞭撻を賜りました，徳島大学大学院医歯薬学研究所 柏田 良樹 教授に心より感謝致します。

本論文作成に種々の有益な御教示，ご助力を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部 田中 直伸 准教授に心より感謝致します。

本研究において種々の有益な御教示，ご助力を賜りました徳島大学 高石 喜久 理事に深謝いたします。

雲南省産植物採集にあたりご助力頂きました昭和大学薬学部 川添 和義 教授，崇城大学 村上 光太郎 教授，中国科学院昆明植物研究所 孫 漢董 教授，李 順林 教授に感謝致します。

抗菌活性を評価していただきました，国際医療福祉大学 八木 秀樹 教授，多田納 豊 博士に厚く御礼致します。

本研究を行うにあたり，ご指導，ご援助を賜りました昭和薬科大学薬学部 栗本 慎一郎 博士に深謝致します。

御協力を賜り，励ましてくださいました，徳島大学薬学部生薬学研究室の皆様には深く感謝致します。

最後に，応援してくれた私の家族，心の支えとなってくれた友人達に心から感謝致します。

## 実験の部

### General Experimental Procedures.

Optical rotations and IR spectra were recorded on a JASCO P-2200 digital polarimeter and a JASCO FT/IR-6200 spectrophotometer, respectively. UV spectra were obtained using a Hitachi UV-3900H spectrophotometer. CD spectra were taken on a JASCO J-1500 spectrophotometer. NMR spectra were measured by a Bruker AVANCE-500 instrument using tetramethylsilane as an internal standard. HRESIMS spectra were run on a Waters LCT PREMIER 2695. Column chromatography was performed with silica gel 60N (63-210  $\mu\text{m}$ , Kanto Kagaku, Japan), Sephadex LH-20 (25-100  $\mu\text{m}$ , GE Health Care, U.K.), MCI GEL CHP 20P (75-150  $\mu\text{m}$ , Mitsubishi Chemical, Japan), YMC-pack ODS-A (S-50  $\mu\text{m}$ , YMC Co., Ltd., Japan). MPLC was performed on an Isorera One with SNAP KP-C18-HS (Biotage Japan). HPLC was performed on JASCO apparatus consisting of a PU-2089 Plus pump, a UV-2075 Plus spectrometer (at the wavelength of 254 nm), OR-2090 Plus optical rotation detector, and a CO-2065 plus column oven, equipped with COSMOSIL Cholester (250  $\times$  20 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Nacalai Tesque), COSMOSIL  $\pi$ NAP (250  $\times$  20 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Nacalai Tesque), COSMOSIL 5C<sub>18</sub> MS-II (250  $\times$  20 mm; 5  $\mu\text{m}$ , Nacalai Tesque), Mightysil RP-18GP (250  $\times$  20 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Kanto Kagaku) or Mightysil RP-18GP II (250  $\times$  20 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Kanto Kagaku). TLC was conducted on precoated silica gel 60 F254 (Merck, Germany) and spots were detected by UV illumination and by spraying cerium sulfate reagent followed by heating.

## 第 2 章の実験

### Plant material

*Rubia yunnanensis* was purchased in August, 2008, in Yunnan Province, China. The plant was identified by Professor Li-Shan Xie of the Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, China, and voucher specimens (08JY0016) were deposited in the herbarium of Tokushima University.

### Extraction and isolation

The dried roots of *R. yunnanensis* Diels (3.7 kg) were crushed and extracted with 70% acetone aq. (10 L  $\times$  3) at room temperature for 3 days. The 70% acetone aq. extracts were concentrated under reduced pressure to give a residue (903 g). A part of the extract (258 g) was partitioned with EtOAc and H<sub>2</sub>O. The EtOAc-soluble material was subjected to silica gel column (CHCl<sub>3</sub>/acetone, 1:0 to 1:0) to give seven fractions (frs. 1–7). Separation of fr. 4 on Sephadex LH-20 column (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 1:1) afford four fractions (frs. 4.1–4.4). Fr. 4.2 was applied to a silica gel column (*n*-hexane/acetone, 9:1 to 0:1) to give 13 fractions (frs. 4.2.1–4.2.13). Fr. 4.2.8 was separated by a silica gel column (toluene/EtOAc, 8:1 to 4:1) and ODS HPLC (Mightysil RP-18GP II, 20  $\times$  250 mm, Kanto Kagaku,

MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30) to give rubiaquinones C (**3**, 6.5 mg), D (**4**, 12.5 mg) and E (**5**, 10.4 mg). Fr. 4.3 was subjected to silica gel chromatography (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc, 8:2 to 0:1) to afford four fractions (frs.4.3.1–4). Fr. 4.3.3 was chromatographed over a Sephadex LH-20 column (MeOH) and ODS column (MeOH/H<sub>2</sub>O, 8:2 to 1:0) to give six fractions (frs. 4.3.3.1–6). Fr. 4.3.3.3 was applied to silica gel column (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 1:0 to 0:1) to give five fractions (frs. 4.3.3.3.1–5). Rubiaquinone B (**2**, 2.3 mg) was isolated from fr. 4.3.3.3.1 using ODS HPLC (COSMOSIL 5C<sub>18</sub> MS-II, 20 x 250 mm, Nacalai Tesque, MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30). Purification of fr. 4.3.3.3.3 by reversed-phase HPLC (COSMOSIL πNAP, 20 x 250 mm, MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30) gave rubiaquinone A (**1**, 4.7 mg).

#### Rubiaquinone A (**1**)

Yellow amorphous solid; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3416, 1707, and 1670 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  261 ( $\epsilon$  23100), 270 (30400), 311 (6130 sh), and 385 (5140) nm; ECD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -1.1 (334), -1.0 (281), and +5.1 (243); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (Table 2.1); HRESIMS:  $m/z$  395.0899 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>Na, 395.0895).

#### Rubiaquinone B (**2**)

Red amorphous solid; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3459, 3331, 1677, 1608, 1574, and 1558 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  270 ( $\epsilon$  56,000) and 384 (9,230) nm; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (Table 2.1); HRESIMS:  $m/z$  567.1070 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>33</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>Na, 567.1056).

#### Rubiaquinone C (**3**)

Red amorphous solid; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3443, 1675, 1610, and 1574 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  270 ( $\epsilon$  37,200) and 382 (5,990) nm; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (Table 2.1); HRESIMS:  $m/z$  567.1066 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>33</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>Na, 567.1056).

#### Rubiaquinone D (**4**)

Red amorphous solid; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3448, 1707, 1664, and 1589 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  253 ( $\epsilon$  34,960), 261 (36,944), 270 (39,892), 307 (10,021 sh), and 377 (7,249) nm; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (Table 2.2); HRESIMS:  $m/z$  607.1349 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>36</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>Na, 607.1369).

#### Rubiaquinone E (**5**)

Red amorphous solid; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3417, 1704, 1662, and 1595 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  254 ( $\epsilon$  34,029), 261 (36,820), 270 (39,657), 305 (10,271 sh), and 377 (7,422) nm; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (Table 2.2); HRESIMS:  $m/z$  607.1360 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>33</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>Na, 607.1369).

#### Optical resolution of rubiaquinone A (**1**)

Optical resolution of rubiaquinone A (**1**) was performed on HPLC using Ceraspher Chiral RU-2

column {Shiseido Co., Ltd., 10 x 150 mm, flow rate 3 mL/min, UV (254 nm) and OR detections} at 50 °C with MeOH as an eluent. (+)-**1**:  $t_R$  14.4 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) +1.39 (215), +2.99 (249), -1.67 (271), -1.44 (303), -1.35 (325), and +0.60 (358). (-)-**1**:  $t_R$  11.7 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -1.45 (214), -4.03 (250), +1.19 (271), +1.74 (305), and -1.43 (357).

#### Optical resolutions of rubiaquinones B (**2**) and C (**3**)

Ceramospher Chiral RU-2 column {10 x 150 mm, flow rate 3 mL/min, UV (254 nm) and OR detections} at 50 °C with MeCN/MeOH/H<sub>2</sub>O (3:3:2) as an eluent. (+)-**2**:  $t_R$  16.9 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -13.07 (209), +19.6 (222), -53.4 (246), +40.9 (267), +6.78 (300), +4.62 (325), and -4.00 (393). (-)-**2**:  $t_R$  9.6 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) +14.8 (210), -9.29 (222), +47.7 (246), -39.4 (269), -5.59 (299), -3.86 (325), and -2.90 (393). (+)-**3**:  $t_R$  12.5 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -4.60 (206), +17.22 (221), -11.45 (246), +11.86 (266), -4.53 (283), -4.88 (320), and +2.54 (375). (-)-**3**:  $t_R$  10.3 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) +8.62 (202), -18.3 (221), +24.62 (247), -12.74 (270), +6.93 (282), +8.58 (317), and -2.95 (374).

#### Optical resolution of rubiaquinone D (**4**)

Ceramospher Chiral RU-2 column {10 x 150 mm, flow rate 3 mL/min, UV (254 nm) and OR detections} at 50 °C with MeCN/MeOH (1:19) as an eluent. (+)-**4**:  $t_R$  28.6 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) +8.97 (215), +12.3 (247), -14.5 (267), +7.98 (280), -5.83 (324), +2.29 (349), and -1.41 (430). (-)-**4**:  $t_R$  36.5 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -6.28 (214), -8.50 (247), +16.39 (263), -11.49 (281), +4.19 (324), -2.68 (348), and +1.19 (430).

#### Optical resolution of rubiaquinone E (**5**)

Ceramospher Chiral RU-2 column {10 x 150 mm, flow rate 3 mL/min, UV (254 nm) and OR detections} at 50 °C with MeCN/MeOH/H<sub>2</sub>O (3:3:2) as an eluent. (+)-**5**:  $t_R$  15.3 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -3.72 (230), -3.92 (242), 0.79 (256), -1.93 (270), +6.05 (288), and -3.07 (356). (-)-**5**:  $t_R$  8.7 min; CD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -4.12 (203), +6.27 (231), +6.55 (242), 3.19 (263), -11.65 (290), and +3.36 (358).

#### Calculations

Conformational searches and DFT calculations were carried out on Spartan 14 program (Wavefunction, Irvine CA) and Gaussian 09 program [102], respectively. Possible enantiomers (1*R*-**1** and 1*S*-**1**) of rubiaquinone A (**1**), and stereoisomers (*M*,1*R*), (*M*,1*S*), (*P*,1*R*), and (*P*,1*S*) of rubiaquinones B (**2**) and C (**3**) were submitted to conformational searches at the Molecular Mechanics (MMFF94s). The initial stable conformers with Boltzmann distributions over 1% were further optimized by DFT calculations at the B3LYP/6-31G(d) level. The stable conformers with Boltzmann distributions over 1% were



subjected to TDDFT calculations at the B3LYP/6-31G+(d,p) level in the presence of MeOH with a polarizable continuum model. The resultant rotatory strengths of the lowest 30 excited states for 1*R*-**1** and 1*S*-**1**, and of the lowest 60 excited states for (*M*,1*R*), (*M*,1*S*), (*P*,1*R*), and (*P*,1*S*) stereoisomers of **2** and **3** were converted into Gaussian-type curves with half-bands (0.3eV) using SpecDis v1.61 [103]. The calculated ECD spectra were composed after correction based on the Boltzmann distribution of the stable conformers. The calculated spectra of 1*R*-**1** and 1*S*-**1** were blue-shifted by 20 nm, while those of (*M*,1*R*), (*M*,1*S*), (*P*,1*R*), and (*P*,1*S*) stereoisomers of **2** and **3** were blue shifted by 10 nm.

### 第 3 章の実験

#### Plant material

*Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl. was purchased in August, 2008, in Yunnan Province, China, and identified by Professor Li-Shan Xie of the Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, China. Voucher specimens (08JY0007) were deposited in the herbarium of Tokushima University.

#### Extraction and isolation

The dried aerial parts of *G. rigescens* (1.9 kg) were crushed and extracted with MeOH (16 L × 3) at room temperature for 3 days. The MeOH extracts were concentrated under reduced pressure to give a residue (354 g), which was partitioned between EtOAc and H<sub>2</sub>O.

The H<sub>2</sub>O-soluble material (257 g) was subjected to Diaion HP-20 chromatography with H<sub>2</sub>O containing increasing amounts of MeOH to give four fractions (frs.1–4). Fr.3 was separated by an ODS column (MeOH/H<sub>2</sub>O, 0:1 to 1:0) and a SiO<sub>2</sub> column (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 12:1 to 0:1) to afford 11 fractions (frs.1.1–11). Fr.1.4 was fractionated by silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH, 20:1 to 0:1), and purified by reversed-phase HPLC (Mightysil RP-18 GP II, MeOH/H<sub>2</sub>O 45:55) to yield rigenolide B (**8**, 3mg). Rigenolide C (**9**, 1mg) was isolated from fr.1.5 using ODS HPLC (Mightysil RP-18 GP II, MeOH/H<sub>2</sub>O 45:55).

The EtOAc-soluble material (88 g) was partitioned with *n*-hexane and 90% MeOH aq., and the 90% MeOH aq.-soluble material (42 g) was subsequently partitioned with CHCl<sub>3</sub> and 50% MeOH. The 50% aq. MeOH aq.-soluble material (12 g) was subjected to chromatography over MCI GEL CHP 20P (MeOH/H<sub>2</sub>O, 0:1 to 1:0) to give 14 fractions (frs.1–14). Fr. 5 was fractionated by SiO<sub>2</sub> column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 30:1 to 0:1) to yield 10 fractions (frs. 5.1–10). Rigenolide D (**10**, 2 mg) was isolated from fr. 5.4 using ODS HPLC {Mightysil PR-18GP, MeOH/H<sub>2</sub>O (15:85)}. Repeated column chromatographies of fr. 6 on a silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 30:1 to 0:1), an ODS (MeOH/H<sub>2</sub>O, 3:7 to 1:0), followed by a silica gel (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc, 10:1 to 0:1) gave frs. 6.1–6.5. Purification of fr. 6.3 by ODS HPLC {(Mightysil RP-18GP, MeOH/H<sub>2</sub>O (17:83)) furnished rigenolide E (**11**, 1 mg).

Fr. 7 was fractionated by SiO<sub>2</sub> CC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 20:1 to 2:1) to afford rigenolide A (**7**, 183 mg), along with 12 fractions (frs. 7.1–12). Fr. 7.8 was chromatographed over a silica gel column (CHCl<sub>3</sub>/acetone, 10:1 to 0:1) to afford eight fractions (frs. 7.8.1–8). Fr. 7.8.5 was purified by reversed-phase HPLC {COSMOSIL πNAP, MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50)} to yield rigenolide F (**12**, 5 mg).

Fr. 10 was separated by an ODS column {MeOH/H<sub>2</sub>O (4:6 to 1:0)} to give 17 fractions (frs. 10.1–17). Fr. 10.9 was fractionated by silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 30:1 to 0:1), and purified by reversed-phase HPLC {COSMOSIL Cholester, MeOH/H<sub>2</sub>O (40:60)} to furnish rigenolide H (**14**, 1 mg). Rigenolide G (**13**, 2 mg) was isolated from fr. 10.10 by ODS HPLC {Mightysil RP-18GP, MeOH/H<sub>2</sub>O (45:55)}.

The dried roots of *G. rigescens* (866 g) were cut into small pieces and were extracted with MeOH (4 L × 3). The MeOH extracts were concentrated under reduced pressure to give a residue (234 g), which was partitioned between EtOAc and H<sub>2</sub>O. The EtOAc-soluble material (35 g) was further partitioned with *n*-hexane and 90% MeOH aq.. The 90% MeOH aq.-soluble material (12 g) was subjected to chromatography over YMC ODS-A column (MeOH/H<sub>2</sub>O, 0:1 to 1:0) to give 12 fractions. Fr. 2 was fractionated by MCI GEL CHP 20P chromatography (MeOH/H<sub>2</sub>O, 0:1 to 1:0) to afford fractions 2.1–2.7. Fr. 2.4 was applied to an MPLC ODS column (KP-C18-HS, 400 g) (MeOH/H<sub>2</sub>O, 0:1 to 1:0) to yield fractions 2.4.1–2.4.11. SiO<sub>2</sub> CC (EtOAc/MeOH, 30:1 to 5:1) of fr. 2.4.2 followed by purification by HPLC on COSMOSIL π NAP (MeOH/H<sub>2</sub>O, 45:55) afforded rigenolide L (**18**, 2 mg). Rigenolide K (**17**, 10 mg) was isolated from fr.2.4.8. by HPLC on COSMOSIL π NAP (MeOH/H<sub>2</sub>O, (45:55). Fr. 2.5. was repeatedly chromatographed on SiO<sub>2</sub> CC (CHCl<sub>3</sub>/acetone, 30:1 to 2:1 and CHCl<sub>3</sub>/EtOAc, 5:1 to 0:1), and then purified by HPLC on COSMOSIL π NAP (MeOH/H<sub>2</sub>O (45:55) to give rigenolides I (**15**, 4 mg) and J (**16**, 2 mg). Repeated CC of fraction 3 on MCI GEL CHP 20P (MeOH/H<sub>2</sub>O (0:1 to 1:0), silica gel CC (EtOAc-MeOH, 10:1 to 0:1), followed by HPLC on COSMOSIL π NAP (MeOH/H<sub>2</sub>O, 45:55) afforded rigenolide M (**19**, 8 mg).

#### Rigenolide A (**7**)

Pale yellow amorphous powder;  $[\alpha]_D^{17} -74.2$  (*c* 1.05, MeOH); HRESIMS: *m/z* 543.1462 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>12</sub>Na, 543.1478); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.1.; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.1.

#### Acid hydrolysis and identification of sugar moiety for **7**

A solution of compound **7** (10 mg) in 2.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 mL) was heated at 70°C for 2 hours. The reaction mixture was neutralized with Amberlite IRA-400 anion exchange resin (Organo, Tokyo), filtrated, and concentrated under reduced pressure. The residue was partitioned between EtOAc and H<sub>2</sub>O, and the H<sub>2</sub>O-soluble fraction was analyzed by HPLC [column, Capcell Pak NH<sub>2</sub> SG80 (4.6 mm i.d. ×250 mm, 5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan); solvent, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (17:3); flow rate, 0.75 mL/min; column

temperature: 35 °C; detection, OR.]. The sugar moiety was identified as D-glucose by comparison of its retention time and sign of optical rotation with those of an authentic sample. [ $t_R$ : 16 min, OR (+)].

#### Rigenolide B (**8**)

white amorphous powder; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -72.0 (*c* 0.31, MeOH); HRESIMS: *m/z* 545.1617 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>12</sub>Na, 545.1635); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3424, 2918, and 1700 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  206 (log  $\epsilon$  3.45), 233 (3.37), and 272 (3.23 sh) nm; ECD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -0.55 (278), -1.73 (227), and +1.67 (201); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.3.; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.3.

#### Rigenolide C (**9**)

white amorphous powder; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> -96.6 (*c* 0.10, MeOH); HRESIMS: *m/z* 545.1653 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>12</sub>Na, 545.1635); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3415, 2921, and 1702 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  204 (log  $\epsilon$  3.62), 235 (3.47 sh), and 270 (3.34) nm; ECD (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) -4.30 (273), +2.40 (236), and -3.40 (202); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.3.; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.3.

#### Identification of sugar moieties for rigenolides B (**8**) and C (**9**)

Rigenolides B (**8**, 1.0 mg) and C (**9**, 0.8 mg) was separately treated with 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 mL) at 70 °C for 3 h. After neutralization by anion-exchange resin (IRA-400, ORGANO Co.), solvent was evaporated to give the residue containing the sugar moiety of **8** and **9**, respectively.

The residue containing the sugar moiety of rigenolide B (**8**) and L-cysteine methyl ester hydrochloride (0.5 mg) was dissolved in pyridine (100  $\mu$ L) and the mixture was heated at 60 °C for 1 h, and then phenylisothiocyanate (10  $\mu$ L) was added to the mixture and heated at 60 °C for 1h. The residue containing the sugar moiety of rigenolide C (**9**) was worked up in the same way.

HPLC analysis {Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR-II, Nacalai Tesque, 4.6  $\times$  250 mm, flow rate 0.8 mL/min, UV detection at 250 nm, eluent CH<sub>3</sub>CN / 50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aq. 1:3, column temperature 35 °C} of the reaction mixture gave a peak at 17.2 min. The retention time was identical to that of the derivative prepared from authentic D-glucose.

#### Calculations

Conformational searches and DFT calculations were carried out on Spartan 14 (Wavefunction, Irvine, CA) and Gaussian 09 programs [102], respectively. Possible four diastereomers [1*S*,9*R*,3"*R*,8"*R*; 1*S*,9*R*,3"*S*,8"*S*; 1*R*,9*S*,3"*R*,8"*R*; 1*R*,9*S*,3"*S*,8"*S*] of rigenolides B (**8**) and C (**9**) were subjected to conformational search using MMFF94s as the force field. The initial stable conformers with Boltzmann distributions over 1% (6, 8, 9, and 11 conformers, respectively) were further optimized by DFT calculations at the B3LYP/6-31G(d) level in the presence of MeOH with a polarizable continuum model (PCM). The stable conformers with Boltzmann distributions over 1% were subjected to TDDFT

calculations at the B3LYP/6-31G(d) level in the presence of MeOH with a PCM. The resultant rotatory strengths of the lowest 30 excited states for each conformer were converted into Gaussian-type curves with half-bands (0.3 eV for 1*S*,9*R*,3"*R*,8"*R* and 1*S*,9*R*,3"*S*,8"*S*; 0.2 eV for 1*R*,9*S*,3"*R*,8"*R* and 1*R*,9*S*,3"*S*,8"*S*) using SpecDis v1.61 [103]. The calculated CD spectra were composed after correction based on the Boltzmann distributions of the stable conformers. The calculated ECD spectrum of 1*S*,9*R*,3"*R*,8"*R* was red-shifted by 10 nm.

#### Rigenolide D (**10**)

White amorphous solid; HRESIMS  $m/z$  221.0793 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>Na, 221.0790); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.4.; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.4.

#### Rigenolide E (**11**)

White amorphous solid; HRESIMS  $m/z$  191.0688 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>Na, 191.0684); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.4.; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.4.

#### Rigenolide F (**12**)

White amorphous solid;  $[\alpha]_D^{17}$  -178.0 (*c* 0.44, MeOH); HRESIMS  $m/z$  423.1261 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>Na, 423.1267); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.7.; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.7.

#### Rigenolide G (**13**)

White amorphous solid;  $[\alpha]_D^{25}$  -162.3 (*c* 0.18, MeOH); HRESIMS  $m/z$  465.1387 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>Na, 465.1373); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.7.; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.7.

#### Rigenolide H (**14**)

White amorphous solid;  $[\alpha]_D^{18}$  -76.1 (*c* 0.12, MeOH); HRESIMS  $m/z$  575.1357 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>Na, 575.1377); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.5.; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): See Table 3.6.

#### Acetylation of rigenolides F–H (**12–14**)

Rigenolide F (**12**, 1.0 mg) was treated with acetic anhydride (500 μL) and dry pyridine (500 μL) at room temperature for 6 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to afford peracetyl derivative (**12a**, 1.3 mg). In the same way, peracetyl derivatives (**13a**, 1.1 mg; **14a**, 1.0 mg) of rigenolides G (**13**) and H (**14**) were prepared. The <sup>1</sup>H NMR data and specific rotation values for **12a** and **13a** were identical to the literature data for tetraacetylsweroside [96], while those for **14a** were coincident with peracetyl derivative prepared from 2'-*O*-(2,3-dihydroxybenzoyl)-swertiamarin (**17**).

2'-*O*-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-swertiamarin pentaacetate (**14a**)

Pale yellow amorphous solid;  $[\alpha]_D^{20} -51.0$  (*c* 0.10, MeOH); HRESIMS  $m/z$  743.1767  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{33}H_{36}O_{18}Na$ , 743.1799);  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta_H$  7.80 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.4$  Hz, H-6"), 7.50 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.4$  Hz, H-4"), 7.36 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-5"), 7.27 (1H, s, H-3), 5.55 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-1), 5.50 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-3'), 5.38 (1H, dd,  $J = 15.7, 2.7$  Hz, H-10a), 5.34 (1H, m, H-8), 5.27 (1H, dd,  $J = 9.4, 2.7$  Hz, H-10b), 5.18 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-1'), 5.15 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-4'), 5.12 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-2'), 4.69 (1H, ddd,  $J = 11.8, 11.8, 2.8$  Hz, H-7a), 4.34 (1H, dd,  $J = 12.5, 4.5$  Hz, H-6'a), 4.27 (1H, ddd,  $J = 11.8, 4.9, 1.6$  Hz, H-7b), 4.20 (1H, dd,  $J = 12.5, 4.5$  Hz, H-6'b), 4.04 (1H, ddd,  $J = 9.0, 4.5, 2.1$  Hz, H-5'), 2.92 (1H, dd,  $J = 9.6, 1.5$  Hz, H-9), 2.31, 2.28, 2.07, 2.02, 1.94 (each 3H, s, OAc), 1.80 (1H, ddd,  $J = 13.5, 11.8, 4.9$  Hz, H-6a), 1.71 (1H, m, H-6b).

rigenolide I (**15**)

Colorless oil;  $[\alpha]_D^{27} +1.8$  (*c* 0.04,  $CHCl_3$ ); HRESIMS:  $m/z$  207.0636  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_9H_{12}O_4Na$ , 207.0633);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): See Table 3.2.;  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): See Table 3.2.

rigenolide J (**16**)

Colorless oil;  $[\alpha]_D^{28} -7.6$  (*c* 0.12,  $CHCl_3$ ); HRESIMS:  $m/z$  221.0789  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{10}H_{14}O_4Na$ , 221.0790);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): See Table 3.2.;  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): See Table 3.2.

Rigenolide K (**17**)

Off-white amorphous powder;  $[\alpha]_D^{28} -169.0$  (*c* 0.93, MeOH); HRESIMS:  $m/z$  515.1163  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{23}H_{24}O_{12}Na$ , 515.1165);  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ ): See Table 3.5.;  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ ): See Table 3.6.

Methanolysis of **17**

To a solution of rigenolide K (**17**, 4.4 mg) in MeOH (500  $\mu$ L) 0.05M NaOMe/MeOH (200  $\mu$ L) was added, and the mixture was left stand for 3 h at room temperature. The reaction mixture was neutralized with Dowex 50WX8-100, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was partitioned between  $CHCl_3$  and 50% MeOH. A phenolcarboxylic acid derivative (0.7 mg) was obtained from the  $CHCl_3$ -soluble fraction, which was identified as methyl 2,3-dihydroxybenzoate. The 50% MeOH-soluble fraction was purified by silica gel column chromatography [ $CHCl_3$ -MeOH (20:1)] to give a secoiridoid glucoside (1.0 mg), which was identified as gentiopicroside by spectral analysis.

### Rigenolide L (**18**)

Off-white amorphous powder;  $[\alpha]_D^{18} - 184.7$  (*c* 0.77, MeOH); HRESIMS:  $m/z$  517.1323  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{23}H_{26}O_{12}Na$ , 517.1322);  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ ): See Table 3.5.;  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ ): See Table 3.6.

### Methanolysis of **18**

A solution of rigenolide L (**18**, 2.0 mg) in MeOH (500  $\mu$ L) and 0.05M NaOMe/MeOH (200  $\mu$ L) was left stand for 3 h at room temperature. The reaction mixture was worked up the same way as described for **34** to give swertiamarine (0.8 mg) and methyl 2,3-dihydroxybenzoate (0.4 mg).

### Rigenolide M (**19**)

Off-white amorphous powder;  $[\alpha]_D^{28} - 71.7$  (*c* 0.19, MeOH); HRESIMS:  $m/z$  533.1271  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{23}H_{24}O_{12}Na$ , 533.1271);  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ ): See Table 3.5.;  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ ): See Table 3.6.

### Methanolysis of **19**

A solution of rigenolide M (**19**, 4.0 mg) in MeOH (500  $\mu$ L) was treated with 0.05M NaOMe/MeOH (200  $\mu$ L) at room temperature for 3 h, and worked up as described above to afford sweroside (2.8 mg) and methyl 2,3-dihydroxybenzoate (0.7 mg).

### DPPH free-radical scavenging assay

Each sample (2, 10, 50, 100  $\mu$ g/mL) in EtOH (100  $\mu$ L) was added to 100  $\mu$ L of a DPPH solution (60  $\mu$ M, in EtOH). After mixing gently and stand for 30 min at room temperature, optical densities were measured at 540 nm using microplate reader. L-Ascorbic acid was used as a positive control.

## 参考文献

- 1) Luo, X. R.; Chen, W. Q. 'Flora of China: Rubiaceae', Science Press, Beijing **1999**, Vol. 71, S. 287.
- 2) Aberoumand, A. *World J. Dairy Food Sci.* **2011**, *6*, 71-78.
- 3) Yoshioka, S. *Color: Design Creativity* **2010**, *4*, 1.
- 4) Xu, K.; Wang, P.; Wang, L.; Liu, C.; Xu, S.; Cheng, Y.; Wang, Y.; Li, Q.; Lei, H. *Chem. Biodiversity* **2014**, *11*, 341-363.
- 5) Itokawa, H.; Qiao, Y.-F.; Takeya, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1435-1437.
- 6) Chen, X.-Q.; Zhao, S.-M.; Wang, Z.; Zeng, G.-Z.; Huang, M.-B.; Tan, N.-H. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 9673-9678.
- 7) Chang, L.-H.; Chavez, D.; Gills, J.-J.; Fong, H.-H.-S.; Pezzuto, J.-M.; Kinghorn, A.-D. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7157-7162.
- 8) Ho, L.; Don, M.; Chen, J. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 330-333.
- 9) Singh, R.; Geetanjali; Chauhan, S. M. S. *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1241-1263.
- 10) Murti, V. V. S.; Seshadri, T. R.; Sivakumaran, S. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1524.
- 11) Koyama, J.; Ogura, T.; Tagahara, K.; Konoshima, T.; Kozuka, M. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2907-2908.
- 12) Hassanean, H. A.; Ibraheim, Z.Z.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Pharmazie* **2000**, *55*, 317-319.
- 13) Zhao, S.-M.; Wang, Z.; Chen, X.-Q.; Huang, M.-B.; Tan, N.-H. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 3041-3043 .
- 14) Zhao, S.; Wang, Z.; Zeng, G.; Song, W.; Chen, X.; Li, X. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5576-5579.
- 15) Itokawa, H.; Ibraheim, Z. Z.; Qiao, Y.-F.; Takeya, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1869-1872.
- 16) Ibraheim, Z.Z.; Gouda, Y. G.; **2010**, *33*, 225-233.
- 17) Qiao, Y.-F.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Iitaka, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2896-2898.
- 18) Wang, Z.; Zhao, S.-M.; Hu, Y.-Y.; Feng, L.; Zhao, L.-M.; Di, Y.-T.; Tan, N.-H. *Phytochemistry* **2018**, *145*, 153-160.
- 19) Lumb, J.-P.; Trauner, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2870-2871.
- 20) Lumb, J.-P.; Choong, K. C.; Trauner, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9230-9231.
- 21) Itokawa, H.; Saito, K.; Morita, H.; Takeya, K.; Yamada, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2984-2989.
- 22) Itokawa, H.; Takaya, K.; Mori, N.; Taknashi. T.; Sonobe, T.; Mihara, K.; Tsukagoshi. S.; *Proc. Int. Congr. Chemother.* **1983**, *16*, 284/114-284/116.
- 23) Morikawa, T.; Tao, J.; Ando, S.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 638-645.
- 24) Xu, X.-Y.; Zhou, J.-Y.; Fang, Q.-C. *J. Chin. Pharm. Sci.* **1995**, *4*, 157-160.
- 25) Fan, J.-T.; Kuang, B.; Zheng, G.-Z.; Zhao, S.-M.; Ji, C.-J.; Zhang, Y.-M.; Tan, N.-H. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2069-2080.
- 26) Tao, J.; Morikawa, T.; Ando, S.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 654-

- 662.
- 27) Fan, J.-T.; Su, J.; Peng, Y.-M.; Li, Y.; Li, J.; Zhou, Y.-B.; Zeng, G.-Z.; Yan, H.; Tan, N.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8226–8234.
  - 28) 中国医学科学院药物研究所等編, 中藥志, 人民工生出版社, **1959**, *2*, 160-163.
  - 29) 小学館編, 中藥大辞典, 上海科学技術出版社, **1985**, *1*, 80-81.
  - 30) Zou, Cheng; Hao, Xiao-Jiang; Chen, Chang-Xiang; Zhou, J. *Acta Bot. Yunnanica* **1993**, *15*, 89–91.
  - 31) Tao, J.; Morikawa, T.; Ando, S.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 654–662.
  - 32) Liou, M. J.; Wu, T. S. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1283–1287.
  - 33) Fan, J.-T.; Kuang, B.; Zeng, G.-Z.; Zhao, S.-M.; Ji, C.-J.; Zhang, Y.-M.; Tan, N.-H. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2069–2080.
  - 34) Fan, J. T.; Chen, Y. S.; Xu, W. Y.; Du, L.; Zeng, G. Z.; Zhang, Y. M.; Su, J.; Li, Y.; Tan, N. H. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6810–6813.
  - 35) Liou, M.-J.; Wu, P.-L.; Wu, T.-S. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 276–279.
  - 36) Inokuma, Y.; Yoshioka, S.; Ariyoshi, J.; Arai, T.; Hitora, Y.; Takada, K.; Matsunaga, S.; Rissanen, K.; Fujita, M. *Nature* **2013**, *495*, 461-466.
  - 37) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashima, Y.; Kakisawa, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.
  - 38) Yabuuchi, T.; Kusumi, T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 397-404.
  - 39) Kusumi, T.; Yabuuchi, T.; Takahashi, H.; Ooi, T. *J. Synth. Org. Chem.; Jpn.* **2005**, *63*, 1102-1114.
  - 40) Snatzke, G.; Eckhardt, G. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 4543-4558.
  - 41) Bouman, T. D.; Lightner, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3145-3154.
  - 42) Harada, N.; Nakanishi, K. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257-263.
  - 43) Bringmann, G.; Bruhn, T.; Maksimenka, K.; Hemberger, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2717-2727.
  - 44) Kusama, T.; Tanaka, N.; Sakai, K.; Gono, T.; Fromont, J.; Kashiwada, Y.; Kobayashi, J.; *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5176-5179.
  - 45) Tanaka, N.; Takekata, M.; Kurimoto, S.; Kawazoe, K.; Murakami, K.; Damdinjav, D.; Dorjbal, E.; Kashiwada, Y. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 817-819.
  - 46) Niwa, K.; Tanaka, N.; Kashiwada, Y. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 1495-1498.
  - 47) Decosterd, L. A.; Parsons, I. C.; Gustafson, K. R.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Cragg, G. M.; Murata, Y.; Pannell, L. K.; Steiner, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6673-6679.
  - 48) Jiang, R.-W.; Wong, K.-L.; Chan Y.-M.; Xu, H.-X.; But, P.-H, P.; Shaw, P.-C. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2674-2680.
  - 49) Pan, Y.; Zhao, Y.-L.; Zhang, J.; Li, W.-Y.; Wang, Y.-Z. *Chem. Biodiversity* **2016**, *13*, 107-150.
  - 50) Dinda, B.; Debnath, S.; Harigaya, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 159-222.
  - 51) Xu, M.; Wang, D.; Zhang, Y.-J.; Yang, C.-R. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 880-883.



- 52) 難波恒雄, 原色和漢藥図鑑 (上), 保育社, **1980**, 168-169.
- 53) Jiang, R.-W.; Wong, K.-L.; Chan, Y.-M.; Xu, H.-X.; But, P. P.-H.; Shaw, P.C. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2674-2680.
- 54) Wang, Y.-M.; Xu, M.; Wang, D.; Zhu, H.-T.; Yang, C.-R.; Zhang, Y.-J. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2012**, *2*, 1-10.
- 55) Wang, H.-L.; Geng, C.-A.; Ma, Y.-B.; Xhang, X.-M.; Chen, J.-L. *Fitoterapia* **2013**, *89*, 183-187.
- 56) Kakuda, R.; Machida, K.; Yaoita, Y.; Kikuchi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 885-887.
- 57) Geng, C.-A.; Jiang, Z.-Y.; Ma, Y.-B.; Luo, J.; Zhang, X.-M.; Wang, H.-L.; Shen, Y.; Zhou, J.; Chen, J.-J. *Org. Lett.* **2009**, *18*, 4120-4123.
- 58) Jpn. Kokai Tokkyo Koho **1989**, JP 01230593 A 19890914
- 59) Huang, Y.-J.; Lu, H.; Yu, X.-L.; Song, W.-B.; Zhang, S.-W.; Fen, L.-Y.; Xuan, L.-J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5260-5264.
- 60) Leitao, S. G.; Monache, F. D. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2167-2169.
- 61) Huh, H.; Kim, H. K.; Lee, H.-K. *Arch. Pharm. Res.* **1998**, *21*, 436-439.
- 62) Baderschneider, B.; Winterhalter, P. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 2788-2798.
- 63) Calis, I.; Lahloub, M. F.; Sticher, O. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 160-165.
- 64) Kikuchi, M.; Kakuda, R.; Yaoita, Y.; Kikuchi, M. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 1236-1243.
- 65) Wang, Z.; Tang, S.; Ma, C.; Toyota, N.; Kida, H.; Kawasaki, M.; Hattori, M. *J. Trad. Med.* **2008**, *25*, 29-34.
- 66) Kakuda, R.; Iijima, T.; Yaoita, Y.; Machida, K.; Kikuchi, M. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1547-1575.
- 67) Takeda, Y.; Masuda, T.; Honda, G.; Takaishi, Y.; Ito, M.; Ashurmetov, O. A.; Khodzhimatov, O. K.; Otsuka, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1338-1340.
- 68) Wu, H.; Hu, X.; Zhang, X.; Chen, S.; Yang, J.; Xu, X. *J. Med. Plants Res.* **2012**, *6*, 4501-4504.
- 69) Li, X.-C.; Elsohly, H.; Walker, L. A.; Clark, A. M. *Planta Med.* **2005**, *71*, 977-979.
- 70) Kanho, H.; Yaoya, S.; Kawahara, N.; Nakane, T.; Takase, Y.; Masuda, K.; Kuroyanagi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 361-365.
- 71) Iizuka, M.; Warashina, T.; Noro, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 282-286.
- 72) Boros, C. A.; Stermitz, F. R. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1173-1246.
- 73) Tan, R. X.; Wolfender, J.-L.; Ma, W. G.; Zhang, L. X.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 111-116.
- 74) Tan, R. X.; Wolfender, J.-L.; Zhang, L. X.; Ma, W.G.; Fuzzati, N.; Marston, A.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1305-1313.
- 75) Yamamura, S.; Ozawa, K.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 131-136.
- 76) Ran, X.-H.; Ni, W.; Wei, G.; Chen C.-X.; Liu, H.-Y. *Acta Bot. Yunnan.* **2010**, *32*, 83-86.
- 77) Kariyone, T.; Matsushima, G. *J. pharm. Soc. Japan* **1927**, *540*, 133.

- 78) Zhou, Y.; Di, Y.-T.; Gesang, S.; Peng, S.-L.; Ding, L.-S. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 94-102.
- 79) Yang, J.; Huang, F.; Zhou, Y.; Liu, W.; Yi, P.; Li, G. *Heterocycles* **2012**, *85*, 2775-2780.
- 80) Inoue, H.; Ueda, S.; Nakamura, Y.; *Tetrahedron Lett.* **1979**, *101*, 1265-1274.
- 81) Shoji, N.; Umeyama, A.; Sunahara, N.; Arihara, S. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1004-1006.
- 82) Kanai, E.; Machida, K.; Kikuchi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1607-1609.
- 83) Machida, K.; Ogawa, M.; Kikuchi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1056-1057.
- 84) Machida, K.; Ando, M.; Yaoita, Y.; Kakuda, R.; Kikuchi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 732-736.
- 85) Machida, K.; Hishinuma, E.; Kikuchi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 618-621.
- 86) Lin, S.-J.; Tan, C.-H.; Jiang, S.-H.; Li, Y.-M.; Shu, D.-Y. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 2789-2793.
- 87) Zeng, Y.-B.; Mei, W.-L.; Zhao, Y.-X.; Dai, H.-F. *Z. Naturforsch.* **2008**, *63b*, 108-110.
- 88) Fan, Q.-L.; Tan, D.-H.; Liu, J.; Zhao, M.-M.; Han, F.-S.; Zhu, D.-Y. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1927-1932.
- 89) Xu, C.; Chou, G.-X.; Wang, C.-H.; Wang, Z.-T. *Phytochemistry* **2012**, *77*, 275-279.
- 90) Cao, T.-W.; Geng, C.-A.; Ma, Y.-B.; Zhang, X.-M.; Zhou, J.; Tao, Y.-D.; Chen, J.-J. *Fitoterapia* **2015**, *102*, 15-22.
- 91) Geng, C.-A.; Zhang, X.-M.; Ma, Y.-B.; Huang, X.-Y.; Chen, J.-J. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2013**, *3*, 243-249.
- 92) Tanaka, T.; Nakashima, T.; Ueda, T.; Tomii, K.; Kouno, I. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 899-901.
- 93) Philip, E. P.; Kathleen, M.; Frederick, W. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1275-1276.
- 94) Coleman, R. S.; Grant, E. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10889-10904.
- 95) Cambie, C. R.; Lal, R. A.; Rickard, E. F. C.; Tanaka, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1857-1861.
- 96) Shiobara, Y.; Kato, K.; Ueda, Y.; Taniue, K.; Syoha, E.; Nishimoto, N.; Oliveira, F. D.; Akisue, G.; Kubota, M.; Hashimoto, G. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1649-1652.
- 97) Cuvelier, M.-E.; Richard, H. Berset, C. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 324-325.
- 98) Natella, F.; Nardini, M.; Felice, M. D.; Scaccini, C. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1453-1459.
- 99) Fukumoto, L. R.; Mazza, G. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3597-3604.
- 100) Kawabata, J.; Okamoto, Y.; Kodama, A.; Makimoto, T.; Kasai, T. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5468-5471.
- 101) Pan, Y.; Zhang, J.; Shen, T.; Zhao, Y.-L.; Zuo, Z.-T.; Wang, T.-Z.; Li, W.-Y. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30*, 232-240.
- 102) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V. Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers,

E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, Revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2010.

103) Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Bringmann, G. *SpecDis*, Version 1.61; University of Wuerzburg: Germany, 2013.