

崇城大学学位論文

終末糖化生成物の産生を抑制するイカリソウ由来の
プレニルフラボノイドに関する研究

平成 27 年度

中嶋 圭介

終末糖化生成物の産生を抑制するイカリソウ由来の
プレニルフラボノイドに関する研究

中嶋 圭介

**Study on prenylflavonoids isolated from *Epimedium*
Herba having the inhibition activity of Advanced
Glycation End-products.**

Keisuke Nakashima

March, 2016

略語表

本研究において、次の略語を使用した。

Ac	: Acetyl
AGE	: Advanced glycation end product
CMA	: <i>N</i> ^ω -(Carboxymethyl) arginine
Calcd	: Calculated
CML	: <i>N</i> ^ε -(Carboxymethyl) lysine
¹³ C-NMR	: ¹³ C -Nuclear magnetic resonance
C : M : W	: CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O
DMAP	: N,N-dimethyl-4-aminopyridine
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
ECL	: Enhanced chemiluminescence
EK-B	: Epimedokoreanin B
EK-C	: Epimedokoreanin C
eq	: Equivalent
Et ₂ O	: Diethyl ether
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
HR-ESI-MS	: High resolution electrospray ionization mass spectrometry
EtOH	: Ethanol
FAB-MS	: Fast atom bombardment mass spectrometry
FBS	: Fetal bovine serum
Fig.	: Figure
Fr.	: Fraction
Glc	: Glucose
GOLD	: Glyoxal-lysine dimer
HMBC	: ¹ H Detected Multiple Bond Connectivity
COSY	: Correlation Spectroscopy
¹ H-NMR	: Proton-1 nuclear magnetic resonance
H : A	: Hexane : Acetone
HE	: Hematoxylin-eosin
HPLC	: High performance liquid chromatography
HRP	: Horseradish peroxidase
ICA-II	: Icariside II

Ig	: Immunoglobulin
LDL	: Low-density lipoprotein
Na-PB	: Sodium phosphate buffer
MeOH	: Methanol
MTPA-Cl	: α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl Chloride
OPD	: <i>o</i> -Phenylenediamine
ODS	: Octadecylsilyl
PDE V	: phosphodiesterase type V
PBS	: Phosphate-buffered saline
Prep	: Preparative
Rha	: Rhamnose
SiO ₂	: Silicagel
Solv	: Solvent
r.t.	: Room temperature
TEA	: Triethylamine
TLC	: Thin-layer chromatography
TMS	: Tetramethylsilane
t _R	: Retention time
Tween	: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
WSC	: water-soluble carbodiimide
Xyl	: Xylose

目次

序論.....	1
本論	
第1章 AGEs 生成阻害作用を有する天然物抽出エキスの探索	
1-1 天然抽出物エキスの調製	5
1-2 生薬エキスの AGEs 生成阻害活性.....	6
1-3 小括	8
第2章 イカリソウの成分研究	
2-1 イカリソウ (<i>Epimedii Herba</i>) について	9
2-2 イカリソウの既知成分.....	11
2-3 抽出・分離	
2-3-1 イカリソウの CML, CMA 生成阻害活性画分の検討.....	13
2-3-2 イカリソウ由来フラボノイドの抽出・分離	15
2-4 構造解析	
2-4-1 イカリソウ由来フラボノイドの既知化合物の構造について	16
2-4-2 イカリソウ由来フラボノイドの新規化合物の構造決定	
2-4-2-1 Icarinoside A (31), B (32), C (39) の構造決定.....	18
2-4-2-2 Koreanoside F (34), G (37), H (38), I (33) の構造決定	23
2-4-2-3 Korepimodoside D (40), E (41), F (42) の構造決定	28
2-4-2-4 Koreanoside E1 (35), E2 (36) の構造決定.....	32
2-4-2-5 Epimedinonin G (43), G1 (43-1), G2 (43-2)の構造決定	37
2-4-2-6 Epimedinonin H (44), H1 (44-1), H2 (44-2)の構造決定	40
2-4-2-7 Epimedinonin E (45), F (46) の構造決定	43
2-4-2-8 Epimedinokoreanin C1 (EK-C-1), C2 (EK-C-2)の構造決定	45
2-5 小括	51
第3章 イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CML, CMA 生成阻害活性試験	
3-1 イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CML, CMA 阻害活性のスクリーニング	
3-1-1 イカリソウ由来フラボノイドの活性試験用サンプルについて.....	56
3-1-2 CML, CMA 生成阻害活性試験の方法.....	57
3-1-3 イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CML 生成阻害作用の検討....	58
3-1-4 イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CMA 生成阻害作用の検討....	59
3-2 グリオキサールによる CML, CMA 生成に対する阻害活性の検討.....	61

3-3	I型コラーゲンに生成する CML, CMA の阻害活性の検討	62
3-4	小括	64
第4章 CML, CMA 生成阻害活性プレニルフラボノイドの構造活性相関		
4-1	カテコール構造の重要性の検討	67
4-2	プレニル基の活性の重要性の検討	69
4-3	光学異性体の CML, CMA 生成阻害作用の比較	71
4-4	小括	72
総括		74
謝辞		79
実験の部		80
引用文献		108

イカリソウ由来の AGEs 生成阻害化合物の探索研究

崇城大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 中嶋圭介

【実験背景・目的】

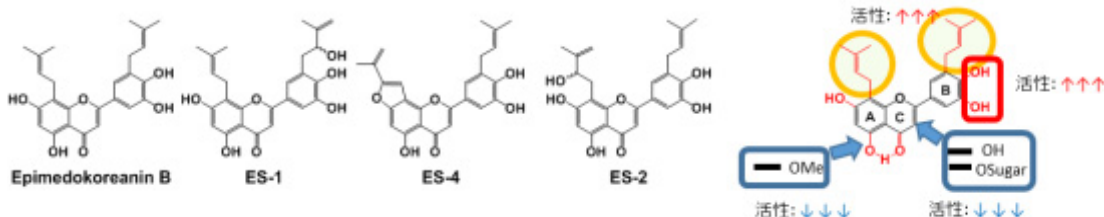
AGEs は糖とアミノ酸のメイラード反応により生成する終末糖化生成物 (Advanced glycation end products) の総称である。AGEs は動脈硬化症の病変部位や糖尿病合併症、骨粗しょう症などの老化性疾患の発症や進展に関与するという報告がなされており、近年創薬分野や化粧品分野で注目を集めている。この AGEs の生成を抑制し様々な病態の発症や進展を抑える目的で常用の可能な生薬エキスを中心に、抗 CMA モノクローナル抗体を用いた競合的 ELISA 方による AGEs 生成阻害スクリーニングを行った結果、イカリソウに顕著な CMA 生成阻害活性が認められた。この結果を受けて、イカリソウより、AGEs の構造体で特に長期的な酸化ストレス蓄積の指標となる他、動脈硬化巣に集積するなどの報告がある CML, またコラーゲンに特異的に生成する AGEs 構造体のひとつである CMA に着目し、その生成を阻害する天然化合物の探索を行っている。

【実験方法】

メタノール抽出を行ったイカリソウエキスについて各種クロマトグラフィーを用いた分離を行い、AGEs 生成阻害活性を指標に分画化し、化合物を単離、精製した。得られた化合物は各種 NMR 測定し、詳細なスペクトル解析を行うことで構造式を決定した。また得られた化合物に対して CML, CMA それぞれのモノクローナル抗体を一次抗体に、二次抗体として HRP を用いた競合的 ELISA により CML, CMA の生成阻害試験を行った。

【結果・考察】

イカリソウ由来の分画の生成阻害活性試験の結果、イカリソウに含まれているプレニルフラボノイド類に強い CML, CMA の生成阻害活性があることが示唆された。この結果をもとに、イカリソウの活性成分の探索研究を行い、これまでに既知プレニルフラボノイド 25 種、新規プレニルフラボノイド 19 種を単離構造決定している。中でも特に生成阻害活性が強かった既知プレニルフラボノイドである Epimedokoreanin B, 及び ES-1, ES-2, ES-4 と仮称する新規プレニルフラボノイドに強い生成阻害活性が認められた。生成阻害活性の強い化合物の構造活性相関を検討した結果、イカリソウ由来のプレニルフラボノイドは、配糖体よりもアグリコンで AGEs 生成阻害活性が強く、またフラボノイド骨格の B 環部分にカテコール基を有し、8, 5' 位にプレニル基を有することが阻害活性作用の発現に必須であると示唆された。



Study on prenylflavonoids isolated from *Epimedii Herba* having the inhibition activity of Advanced Glycation End-products.

Keisuke Nakashima

Epimedii Herba (EH), also known as “Yin Yang Huo” or Horny Goat Weed, has been used in traditional Chinese medicine to treat erectile dysfunction, dysuria, waist and knee pain, infertility, and angina pectoris. EH extract is included in energy drinks for the purpose of tonicity in Japan. Prenylflavonoids are major EH constituents with diverse biological activities, including suppressing nerve degeneration and improving cognitive function in neurological disorders, attenuating hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in osteoblasts, preserving the osteogenic differentiation potential of osteoblasts, inhibiting PDE5 activity, and increasing cellular cGMP by enhancing nitric oxide synthase (NOS) in corpus cavernosum tissue from diabetic rats with erectile dysfunction (ED).

Early protein glycation results in the formation of Schiff bases and Amadori products. Further protein glycation causes molecular rearrangements leading to AGE generation. *N*^ε-(Carboxymethyl)lysine (CML), a major antigenic AGE structure, accumulates in several human and animal tissues during aging and in patients with various diseases, including diabetic nephropathy. *N*^ω-(Carboxymethyl)arginine (CMA) is an acid-labile AGE structure that was discovered in the enzymic hydrolysate of glycated collagen. CMA accumulation in tissue proteins may contribute to the pathophysiology of aging and age-related diseases.

We developed specific monoclonal antibodies against CML and CMA and demonstrated that a specific antibody is a powerful tool for analyzing the efficacy of AGE inhibitors. A previous study showed that astragalosides significantly inhibited the formation of CML and pentosidine, with astragaloside V having the strongest inhibitory effect among all compounds isolated from *Astragali Radix*. However, there are no reports of the inhibitory activity of plants from the genus *Epimedium* against AGE accumulation. A preliminary bioassay showed that the MeOH extract of EH had significant inhibitory effects on CML and CMA formation, which prompted further study of the active constituents of this plant. A bioassay-guided investigation of MeOH EH extract fractions resulted in the isolation of twenty new prenylflavonoids and thirty known compounds. This study reports the isolation and structural determination of new compounds, as well as the inhibitory activities of the isolates against formation of CML and CMA.

The aerial parts of *Epimedium* spp. (3.0 kg) were purchased from Uchida Wakan-yaku and extracted with MeOH. The MeOH extract suppressed both CML and CMA formation at a concentration of 1 mg/mL. The extract was partitioned between *n*-hexane and 80% MeOH, after which the 80% MeOH layer was concentrated under reduced pressure to obtain a

residue. The residue suppressed both CML and CMA formation while the *n*-hexane fraction did not show activity at a concentration of 1 mg/mL. The residue was subjected to column chromatography on an MCI-gel CHP-20P column and eluted with a stepwise gradient system of MeOH (0%, 50%, and 100%) to obtain 1st fraction, 2nd fraction, and 3rd fraction, respectively. The inhibitory activity of the 3 fractions was tested at a concentration of 1 mg/mL. The 2nd and the 3rd fractions almost completely suppressed CML formation. In contrast, the 1st fraction did not show activity. The 2nd and 3rd fractions had potent activity and were rich in prenylflavonoids; therefore, we decided to further separate these fractions using a Sephadex LH-20 column and silica gel chromatography followed by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) purification to get fifty compounds including twenty new ones. The new compounds were determined their chemical structure by spectroscopic data mainly using NMR and MS. Furthermore, comparing with authentic literatures identified the thirty known compounds.

Isolates compounds were evaluated for their inhibitory activities against CML and CMA formation. Epimedokoreanin B (**EK-B**), epimedonins **E**, **G**, and **H** almost completely suppressed CML formation at a concentration of 1 μ M, while pyridoxamine showed weak suppressive activity. **EK-B**, epimedonins **E**, **G**, and **H** also significantly suppressed CMA formation at a concentration of 10 μ M. **EK-B** exhibited markedly more effective inhibition of CML and CMA formation in comparison with that of epimedonins **E**, **G**, and **H**. Structure-activity analysis suggested that the oxygen group attached at C-3 position decreased the activity of prenylflavonoid glycosides. The catechol group in the B ring in compounds might be crucial for inhibition of CML and CMA formation. Furthermore, the prenyl groups attached at C-8 on A ring and at C-5' on B ring in compounds might be crucial for inhibition of CML and CMA formation. A detailed structure-activity relationship study is ongoing. Because the yield of **EK-B** was higher than that of compounds of all isolated from EH is as a representative compound of EH with potent activity against CML and CMA formation.

Herein, the inhibitory effect of EH was measured with an assay system that estimated the formation of CML and CMA using antibodies. Under the assay conditions employed, the EH extract significantly inhibited CML and CMA formation at a concentration of 1 mg/mL. Furthermore, the inhibitory effects of prenylflavonoids isolated from EH on CML and CMA formation were evaluated. **EK-B** significantly inhibited CML and CMA formation relative to that observed in the positive control groups (pyridoxamine and luteolin). These results suggest that **EK-B** could be used as a therapeutic compound because it prevents the development of diabetes complications such as diabetic nephropathy, retinopathy, and neuropathy by inhibiting AGE formation.

序論

近年、世界規模での人口の高齢化が著しく、特に日本では65歳以上の高齢者人口は、1950年には総人口の5%に満たなかったが、1970年に世界保健機構（WHO）や国連の高齢化社会の基準の7%を超え、さらに、1994年にはその倍化水準である14%を超えた「高齢社会」となった。高齢化率はその後も上昇を続け、2007年に超高齢化社会の基準の21%を越え、現在、25.1%に達している。そのような背景から、様々な問題、例えば、加齢に伴う生活習慣病のリスクの増加や、老化性疾患により介護を要するリスクの高い状態のロコモティブシンドロームなどがより深刻になっている。

「健康で長生きする」という人類の根源の欲求を追及する上で、「未病」の維持を目的とする予防医学的な対策が重要な役割を担い始めてきている。著者らの研究室では、これまでに医食同源の観点より、様々な植物由来の有効成分の探索研究を行っている。本研究において、著者は、糖尿病合併症やアテローム性動脈硬化症などの生活習慣病、並びに、骨粗鬆症やアルツハイマー病などの老化性疾患の発症や進展に関与する終末糖化生成物 Advanced glycation end products (AGEs) の生成を阻害する天然有機化合物の発見を目的とし、予防医学への貢献を目指している。

AGEsとは、還元糖とタンパク質の非酵素的な反応であるメイラード反応によって生じる最終生成物の総称であり、このメイラード反応は、グルコースなどの還元糖とタンパク質のアミノ基が反応してアマドリ転位物を形成する前期反応と、アマドリ転位物が酸化、脱水、縮合、転位などの反応を経て、褐色・蛍光・架橋構造を有するAGEs構造体へと変化する後期反応からなる（Fig. 1）。

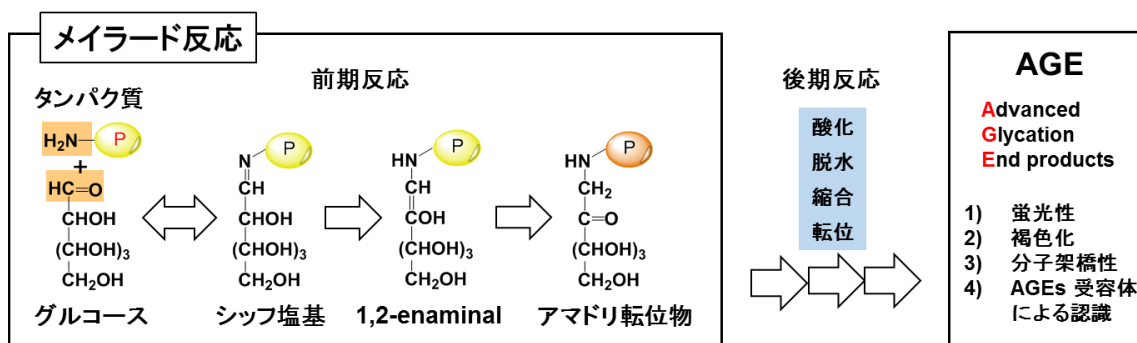


Fig. 1. Maillard reaction. Reducing sugars such as glucose and ribose react with amino residues of proteins and free amino acid, and reaction that occurs between reducing sugars and generate AGEs through formation of Schiff base and Amadori products.

AGEs は加齢に依存して種々の組織に蓄積し、糖尿病合併症やアテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病では、その蓄積が顕著に増加することから、それらの病態の発症や進展に関与すると言われている (Fig. 2)。

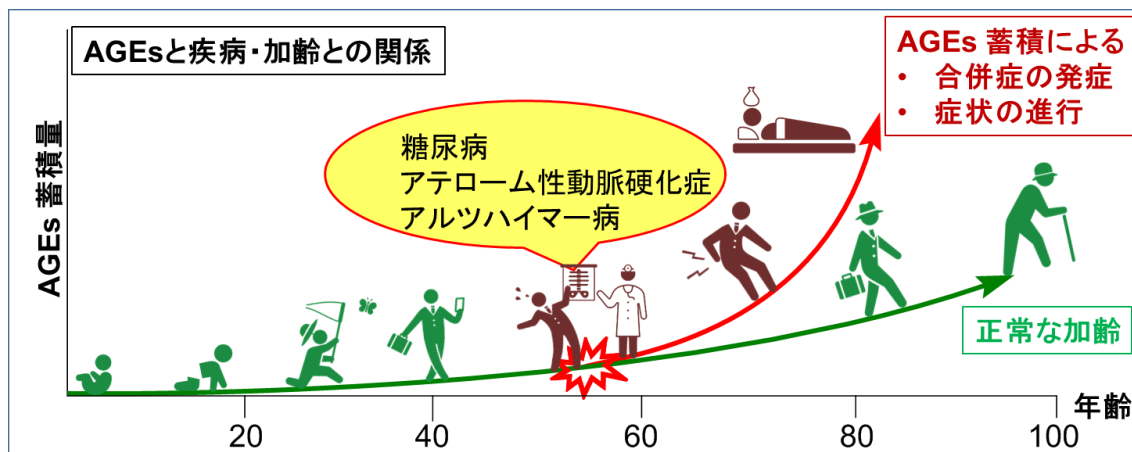


Fig. 2. AGEs accumulation promoted by a lifestyle-related diseases. AGEs accumulate in the body in accordance with age, with such accumulation being enhanced by lifestyle-related diseases such as diabetic complications that result in the denaturation of proteins.

AGEs 構造体には *in vitro* で生成するものを含め、現在、Fig. 3 に示す 12 種を含む、約 30 種が知られている。

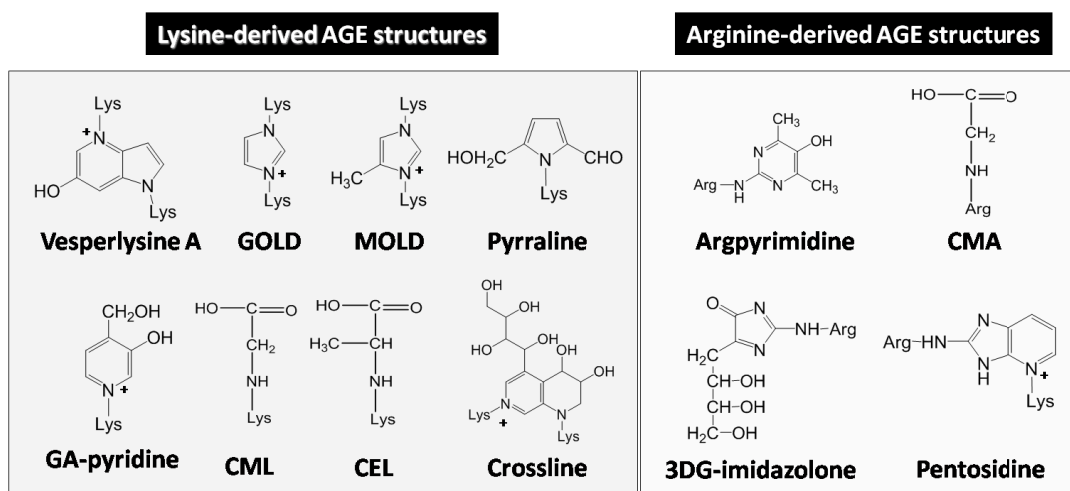


Fig. 3. AGE Structures.

しかしながら、これらすべての構造体が、前述したように架橋構造や蛍光性などの特徴をもつわけではなく、蓄積する部位や惹起する病態などは個々の AGEs 構造体によって様々である。例えば、非蛍光性・非架橋性のリジン由来の AGEs 構造体である *N*^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) は、糖尿病合併症の病変部位や動脈硬化薬のみならず、

肺線維症の肺泡マクロファージなどでも蓄積することが知られている¹。また、CMLは毛細血管内皮細胞に作用し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生を促進することで、血管新生を促し、糖尿病性増殖網膜症の発症に関与することが知られている²。一方、アルギニン由来の *N*^ω- (carboxymethyl) arginine (CMA) は、コラーゲンに特異的に生成する AGEs 構造体の一つであることが知られている。即ち、CMA は糖化コラーゲン中に見出された AGEs 構造体の一つであり⁵、機器分析による解析から、健常人と比較して糖尿病患者では、血中濃度が有意に高いことが報告されている⁶。その他、蛍光性・架橋性 AGEs 構造体である Pentosidine は、リジン残基とアルギニン残基を架橋している蛍光性物質で、糖尿病患者や腎不全患者の血漿や皮膚コラーゲン中で増加することが知られている^{7,8}。

このように、AGEs が様々な病態の発症や進展を誘起することが明らかとなるにつれて、AGEs は、これら疾患に対する予防・治療薬のターゲット分子として注目され、近年では AGEs 生成阻害剤の開発が国内外で活発に行われている⁹⁻¹⁸。現在、医薬品として使われている AGEs 生成阻害薬として、ピリドキサミンが知られており、これまでの研究で、糖尿病モデル動物の腎症、および網膜症の発症を抑制し、その進展が有意に遅延されることが明らかとなっている¹⁹⁻²¹。また、糖尿病ラットにチアミンおよび、その疎水性を高めた誘導体であるベンフォチアミンを投与することによって、腎メサンギウム細胞におけるトランスケトラーゼの発現が上昇すると共に、細胞内 AGEs 含量が低下して微量アルブミン尿の発症を抑制するという報告もある¹⁹。

一般的に、AGEs 生成阻害剤を探索する際、以前は AGEs の蛍光性あるいは褐色性といった特徴を利用した比色定量法が主流であった²²⁻²⁷。しかし、前述したように AGEs 構造体は、構造の違いにより蓄積する部位や惹起する病態が異なり、蛍光性や架橋構造を持たない AGEs 構造体も存在することから、より効果的な疾患ならびに組織特異性を有する AGEs 阻害剤を開発するためには、個々の AGEs 構造体をターゲットとした阻害剤の探索が必要である。ゆえに、そのような阻害剤を探索するためには、HPLC や GC/MS などによる機器分析や種々の AGEs 構造体を認識する特異抗体を用いた免疫学的手法 (ELISA 法など) でのスクリーニングが有効である。その中でも、免疫学的手法は機器分析に比べて簡便であり、同時に多数の検体を測定することが可能であることから、我々は、免疫学的手法を用いて AGEs 生成阻害作用を有する天然有機化合物のスクリーニングを行うこととした。

実際に、著者らは CML, Pentosidine, CEL, Pyrrolidine などをはじめとする多数の AGEs 構造体に対する特異抗体を保有しており、これらを用いた AGEs と病態との関連性の解明および AGEs 生成阻害作用を有する天然有機化合物の探索を行ってきた²⁸⁻³¹。その結果、sophoradiol や lupeol, desgalactotigonin などのトリテルペン化合物やステロイド化合物が CML の生成を阻害することを明らかにした³³。また、天然物抽出エキスを用いて、CML および Pentosidine 生成阻害作用を検討し、オウギ抽出エキスが CML, Pentosidine

両者の生成を有意に阻害すること、および、その活性本体が、トリテルペン配糖体である astragaloside 類であることを明らかにした²⁸。さらに、キクカ抽出エキスが CMA の生成を有意に阻害すること、および、その活性本体が、フラボノイドの luteolin 誘導体であることを明らかにした³⁴。このように、著者らは、これまでに様々な天然薬物が CML、Pentosidine、CMA に対する生成阻害作用を有することを明らかにした。

コラーゲンは真皮、靭帯、腱、骨、軟骨などを構成する主要なタンパク質の一つである。コラーゲンに生成する AGEs とこれら組織における病態との関連については、様々な報告がなされている。例えば、CML 化コラーゲンは骨を形成する骨芽細胞のアポトーシスを誘導し、骨形成を阻害することが報告されており、この現象は骨粗鬆症の原因の一つであると考えられている³⁵。また、コラーゲンの CML 化は、表皮に存在するケラチノサイト (角化細胞) の遊走やコラーゲンへの接着能を低下させることから、糖尿病患者における創傷治癒の遅延には、コラーゲンの CML 化が関与していることが示唆されている³⁶。つまり、これまでは CML がコラーゲンに蓄積する主要な AGEs 構造体として注目されてきたため、コラーゲンの CML 化と病態との関連についての報告は数多く存在する。しかし、著者らのグループの研究により CML だけでなく CMA も、生体のコラーゲンに生成する主要な AGEs 構造体であること、特に CMA はコラーゲン特異的に生成する AGEs であることが明らかとなったため、コラーゲンの AGEs 化によって引き起こされる病態や老化現象に対し、CMA 生成阻害剤も骨粗鬆症や糖尿病合併症、皮膚老化など、様々な病態・老化現象に対して有効性を示すと考えられる。本研究では、①コラーゲン蓄積と病態との関連が明らかにされている AGEs 構造体である CML 並びに②コラーゲン特異的に生成する AGEs 構造体である CMA の 2 つのコラーゲン関連の AGEs 構造体に着目し、その生成を阻害する天然薬物の探索を行うことにした。

本論

第1章 AGEs 生成阻害作用を有する天然物抽出エキスの探索

1-1 天然物抽出エキスの調製

医食同源の観点より茶剤として使える生薬エキスを中心にスクリーニングを行った。具体的には中国後漢時代の薬物学書(本草学書)である「神農本草経」に記載されている365種の生薬のうち、常用が可能とされている「上品」及び「中品」に分類されるものより計42種を選出した(Table 1)。上品は、養命薬「生命を養う目的の薬」であり、無毒で長期服用が可能とされており、中品は、上品に比べ作用は強いが、適正期間であれば少量を毎日摂取できるとされている。選定した生薬42種(Table 1)をそれぞれメタノールで抽出した。抽出液を綿栓濾過して、溶媒を減圧乾固してメタノールエキスを得た。得られたエキスはポリスチレンゲル(Diaion HP-20)カラムに付し、水溶出およびメタノール溶出画分に分画した(Fig. 4)。メタノール溶出画分は溶媒を減圧留去して、生物活性試験用の生薬抽出エキスとした。即ち、ポリスチレンカラムにより各生薬に特徴的な二次代謝産物が濃縮されたメタノール溶出画分を「天然物抽出エキス」として、効率的な各種生物活性スクリーニングに用いた。

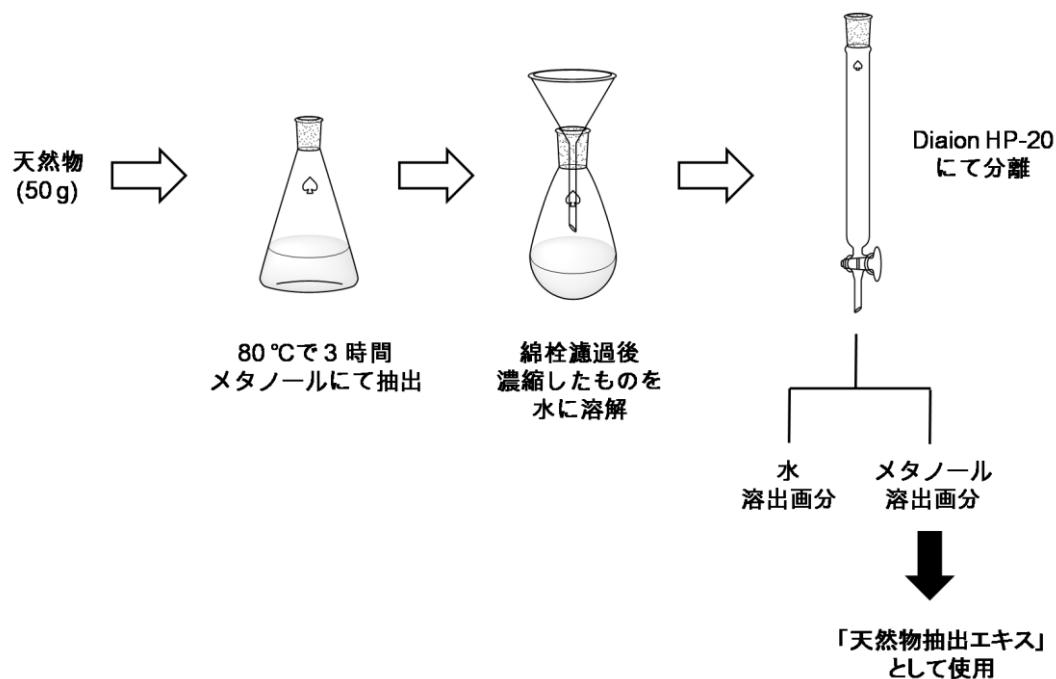


Fig. 4. Preparation of natural medicines extracts for AGEs inhibition activity test.

Table 1. Crude drugs used for this study.

上品 (30 種)			
生薬名 (カナ)	ラテン名	生薬名 (カナ)	ラテン名
禹余糧 (ウヨリョウ)	<i>Limonium</i>	生姜 (ショウキョウ)	<i>Zingiberis Rhizoma</i>
黄連 (オウレン)	<i>Coptidis Rhizoma</i>	升麻 (ショウマ)	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>
遠志 (オンジ)	<i>Polygalae Radix</i>	辛夷 (シンイ)	<i>Magnoliae Flos</i>
藿香 (カッコウ)	<i>Pogostemi Herba</i>	川芎 (センキュウ)	<i>Cnidii Rhizoma</i>
亀板 (キバン)	<i>Testudinis Plastrum</i>	蒼朮 (ソウジュツ)	<i>Atractylodis Lanceae Rhizoma</i>
羌活 (キョウカツ)	<i>Notopterygii Rhizoma</i>	麦門冬 (バクモンドウ)	<i>Ophiopogonis Tuber</i>
菊花 (キクカ)	<i>Chrysanthemi Flos</i>	茯苓 (ブクリョウ)	<i>Hoelen</i>
枸杞葉 (クコヨウ)	<i>Licii Chinense</i>	防風 (ボウフウ)	<i>Saposhnikoviar Radix</i>
胡麻 (ゴマ)	<i>Sesami Semen</i>	大棗 (タイソウ)	<i>Zizyphi Fructus</i>
牛膝 (ゴシツ)	<i>Achyranthis Radix</i>	沢瀉 (タクシャ)	<i>Alismatis Rhizoma</i>
五味子 (ゴミシ)	<i>Schisandrae Fructus</i>	陳皮 (チンピ)	<i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i>
柴胡 (サイコ)	<i>Bupleuri Radix</i>	独活 (ドツカツ)	<i>Angelicae tuhou radix</i>
細辛 (サイシン)	<i>Asiasari Radix</i>	菟糸子 (トシシ)	<i>Cuscutae Semen</i>
酸棗仁 (サンソウニン)	<i>Zizyphi Semen</i>	薏苡仁 (ヨクイニン)	<i>Coicis Semen</i>
蒺藜子 (シツリシ)	<i>Tribuli Fructus</i>	白朮 (ビャクジュツ)	<i>Acractylodis Rhizoma</i>
中品 (12 種)			
生薬名 (カナ)	ラテン名	生薬名 (カナ)	ラテン名
淫羊藿 (インヨウカク)	<i>Epimedii Herba</i>	枳殼 (キコク)	<i>Aurantii Fructus Immaturus</i>
茴香 (ウイキョウ)	<i>Foeniculi Fructus</i>	苦参 (クジン)	<i>Sophorae Radix</i>
黄柏 (オウバク)	<i>Phellodendri Cortex</i>	荆芥 (ケイガイ)	<i>Schizonepetae Spica</i>
葛根 (カッココン)	<i>Puerariae Radix</i>	玄参 (ゲンジン)	<i>Scrophularia Ningpoensis</i>
乾姜 (カンキョウ)	<i>Zingiberis Siccatum Rhizoma</i>	蛇床子 (ジャショウシ)	<i>Cnidii Monnieris Fructus</i>
枳実 (キジツ)	<i>Aurantii Fructus</i>	合歡皮 (ゴウカンヒ)	<i>Albiziae Cortex</i>

1-2 生薬エキスの AGEs 生成抑制活性試験

AGEs の構造体 (Fig. 3) は、その構造の違いにより、生体に蓄積する部位や惹起する病態が異なる。また、蛍光性や架橋性を持たない AGEs も存在する。したがって、より効果的な疾患ならびに組織特異性を有する AGEs 阻害剤の開発するためには、個々の AGEs 構造体をターゲットにした阻害剤の探索が必要である。本研究ではコラーゲンに蓄積することが知られている AGEs 構造体の CML と CMA の生成を阻害することにより、今後問題となる老人性の各種疾患の予防、改善に役立つ天然有機化合物の探索することを目的としている。そこで前項で調製した天然物

抽出エキスのスクリーニングを効率的に行うにあたり、抗 CMA 抗体を用いた ELISA 法を適用することにした。詳細な実験方法は後述 (第 3 章) するが、タンパク質としてゼラチンを、糖質としてグルコースの代わりに 5 単糖のリボースを用いて実験を行った。まず、リボース (30 mM) とゼラチン (2 mg/mL) の混合溶液に天然物抽出エキス (10 mg/mL) を加え、37 °C で 7 日間インキュベーションした後、ゼラチン中に生成した CML, CMA の量を、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法により定量した。そして、サンプル無添加のときに生成する CML, CMA の量 (コントロール) に対する阻害作用を評価した。その結果の一部の CMA 生成阻害実験の結果について Fig. 5 に示す。

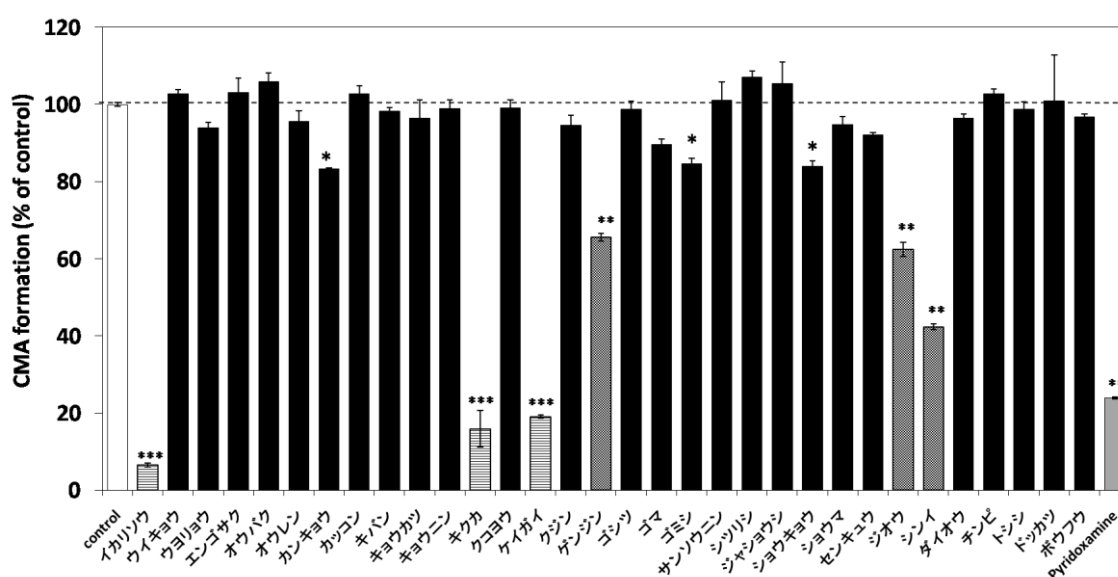


Fig. 5. Effect of crude drugs extracts on CMA formation. Gelatin (2 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with crude drugs extracts (10 mg/mL) in 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CMA content was determined by noncompetitive ELISA. *p < 0.005, **p < 0.001, ***p < 0.0001 compared to control.

縦軸は、コントロールの CMA 生成量を 100% としたときの各天然物抽出エキス添加サンプルの CMA 生成量の比 (%) を示す。その結果、ケイガイ、キクカ、イカリソウは対照薬として用いたピリドキサミンよりも強い生成阻害活性を示した。

1-3 小括

本章では、当研究室で調製した天然物抽出エキスのAGEs 生成阻害活性スクリーニングを行った。その結果、イカリソウ、キクカ、ケイガイの3つの天然抽出物エキスが対照薬として用いたピリドキサミンより強いCMA生成阻害活性（阻害率：80%以上）を示した（Fig. 5, 6）。我々の研究グループで行ったキクカの成分研究より、フラボノイド類のルテオリンに顕著なCMA生成阻害活性が見出された。ケイガイは、シソ科の一年草本で精油成分を多く含むが、活性成分については未検討である。一方、イカリソウはプレニルフラボノイドを中心に多様な成分が含まれること、さらに今回行った天然物抽出エキスのスクリーニングにおいて、最も強いCMA生成阻害活性が観測されたことから、イカリソウに含まれるCMA生成阻害活性本体の解明を企図した。さらに、イカリソウより得られる化合物に関して、CML生成阻害活性試験もあわせて行うことにした。

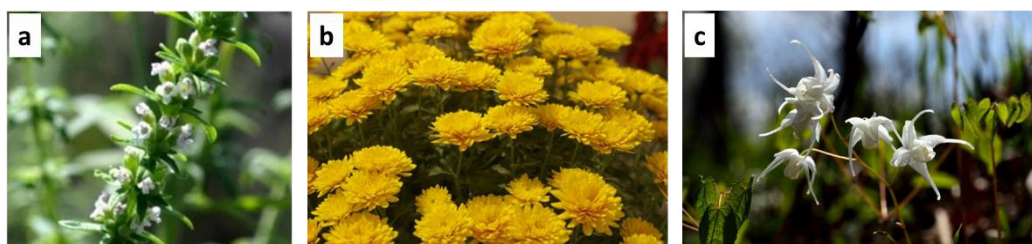


Fig. 6. Natural medicines having strong inhibition activity against CMA formation.

a: *Schizonepetae Spica*. **b:** *Chrysanthemi Flos*. **c:** *Epimedii Herba*.

第2章 イカリソウの CML、CMA 生成阻害成分の探索研究

2-1 イカリソウ (*Epimedii Herba*) について

イカリソウはメギ科 (Berberidaceae) の落葉多年草で、生薬名はインヨウカク (淫羊藿, *yin yan huo*)、英語名は *horny goat weed* と呼ばれる (Fig. 7)。また、三枝九葉草と名付けられるとおり、花枝を持った茎の上に葉が3本伸び、各々の茎に3枚の葉がついている (Fig. 7a)³⁷。イカリソウは主に伝統中国医療において使用され、勃起不全や精液漏、排尿障害、腰と膝の痛み、不妊、狭心症などに効果があるとされている³⁸。日本でも滋養強壯の目的で栄養ドリンクにエキスとして含まれている。また、漢方では二仙湯という方剤の薬味の一つとして用いられる。アメリカなど海外では、エキスがサプリメント剤として流通している (Fig. 7b)。イカリソウには実に様々な種が存在し、中華人民共和国薬典では5種 (*Epimedium brevicornum*, *E. sagittatum*, *E. pubescens*, *E. wushanense*, *E. koreanum*) が基原植物として記載されている。日本薬局方には、それらに2種 (*E. grandiflorum*, *E. sempervirens*) を加え、7種が基原植物として収載されている。これらのうち基本種はヤチマタイカリソウ (*E. grandiflorum*) で、バイカイカリソウ (*E. diphyllum*)、オオバイカリソウ (*E. setosum*)、キバナイカリソウ (*E. koreanum*)、トキワイカリソウ (*E. sempervirens*) など数種が日本に自生する³⁹。中国原産の種として、シンヨウインヨウカク (*E. brevicornum*) とホザキノイカリソウ (*E. sagittatum*) が挙げられる⁴⁰。本実験には、日本薬局方の規格に適合したイカリソウを、生薬卸売業者のウチダ和漢薬から購入した (Fig. 7c)。輸入元が中国であることは明らかであるが、詳しい種名の決定は困難であった。しかし、市場への流通の割合や単離した成分の組成より、主にキバナイカリソウ (*E. koreanum*) (Fig. 7d) であると推察している。

イカリソウの成分研究は、岡山医科大学付属病院薬局 (現 岡山大学病院薬剤部) の赤井が、イカリソウの主要成分の一つである *icariin* をウラジロイカリソウ (*E. macranthum* Morr et Decne) から再結晶法により単離、構造決定した1935年が始まりである⁴¹。また、神戸薬科大学の守安らは、イカリソウの種の違いによるフラボノイド含量の比較検討を、HPLCを用いて行っている。その報告によると、現在日本市場品のイカリソウの大部分を占めると考えられるキバナイカリソウ (*E. koreanum*) の他、多くの種において *icariin* を主成分としているが、日本の伝統に基づいた漢方で用いられる淫羊藿の正條品のホザキノイカリソウ (*E. sagittatum*) は *icariin* ではなく *epimodoside A* を主成分とすることを明らかにしている⁴² (Fig. 8)。また、トキワイカリソウ (*E. sempervirens*) などフラボノイド含有量そのものが微量である種も確認されている。

イカリソウ由来のフラボノイドは、これまでに様々な生物活性が調べられている。例えば、icariin には神経変性を抑えることによる脳障害の改善作用⁴³、骨芽細胞の低酸素誘導性酸化ストレスとアポトーシスを減衰させ、それらの骨形成分化能を保持する作用⁴⁴、icariin、icariside II (ICA-II) にはホスホジエステラーゼ 5 (PDE V) 阻害作用による ED 改善効果⁴⁵などの報告がある。

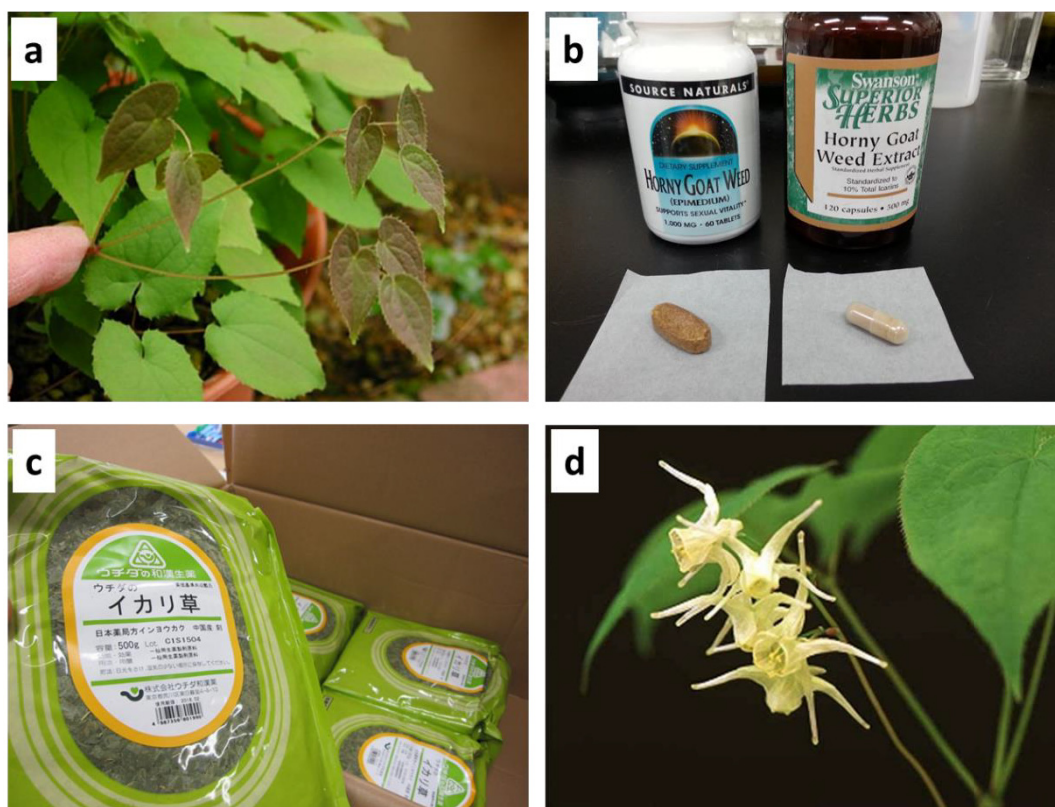


Fig. 7. a: “Nine leaves on three stem” as characteristic *Epimedium* spp. b: Supplements of Honey goat weed. c: *Epimedium Herba* purchased from Uchida Wakanyaku. d: Flower of *E. koreanum*.

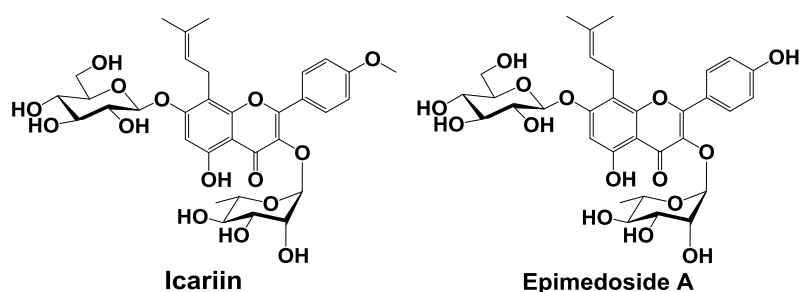


Fig. 8. Representative constituents from *Epimedium Herba*.

2-2 イカリソウの既知成分

これまでに *Epimedium* 属植物の 16 種以上で成分研究が行われており、その結果、既知成分としてアルカロイド、植物ステロール、フラボノイド、リグナン、イオノン、セスキテルペン、フェノール類、およびフェニルエタノイド類など、260 種以上の化合物が単離・構造決定されている³⁷。主成分は icariin を中心としたプレニルフラボノイドであるが、種によって含量が異なる。シソウインヨウカク (*E. brevicornum*) からは、イカリソウの代表的な成分である icariin および epimedin A、B、C を効率的に分離する方法が報告されている⁴⁶。プレニルフラボノイドの配糖体の水酸基の一部がアセチル化されている epimedin I, K, L など、また、構成糖にキシロースを含む配糖体の epimedoside E, ikarisoside F などがキバナイカリソウ (*E. koreanum*) から単離、構造決定されている⁴⁷。その他、icariside II, baohuoside II, 2"-*O*-rhamnosyl icariside II などの配糖体や、アグリコンの icaritin, desmethylicaritin, epimedikoreanin B がジュウモウインヨウカク (*E. pubescens*) から単離されている⁴⁸。さらに、ホザキノイカリソウ (*E. sagittatum*) からは、sagittatosides A, B, C が単離、構造決定されている⁴⁹ (Fig. 9)。

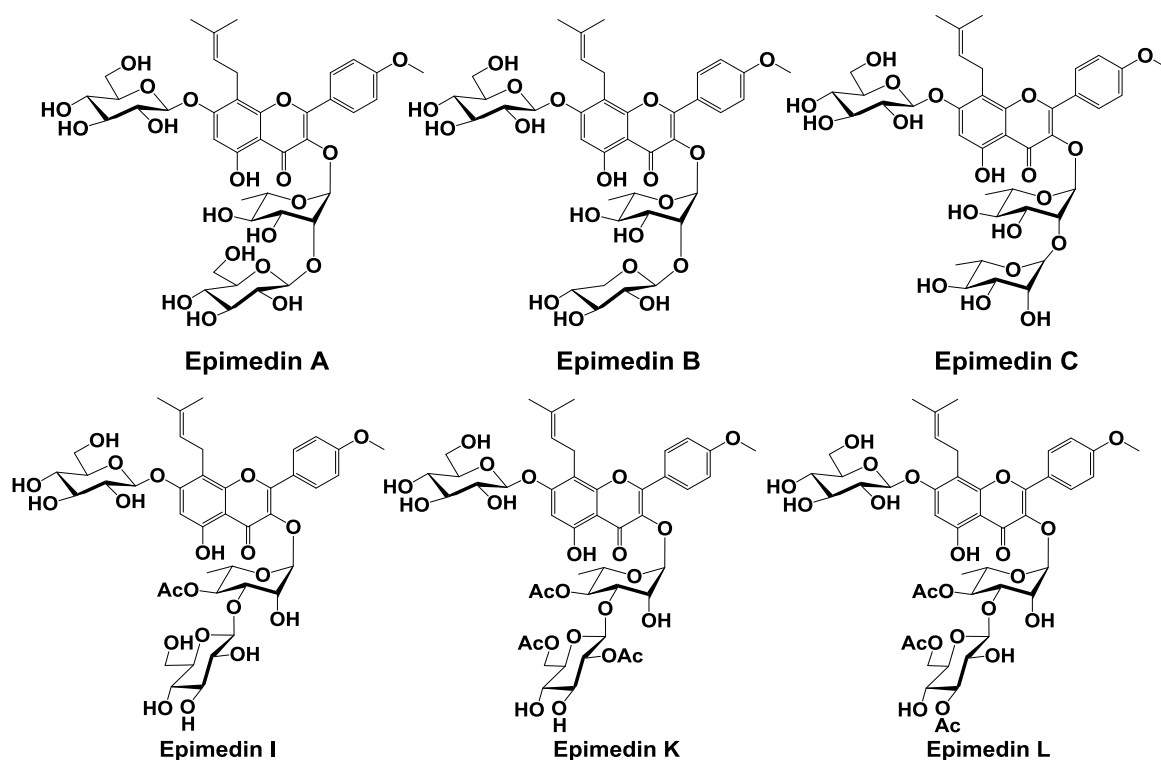
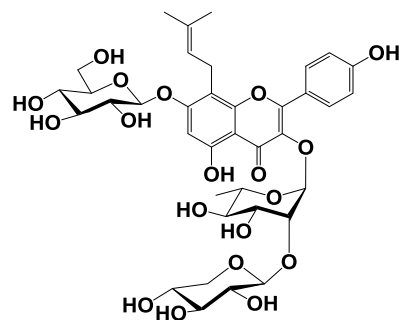
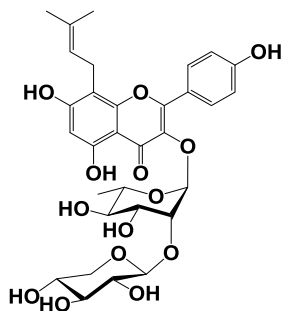


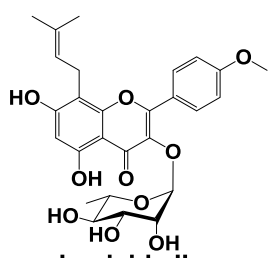
Fig. 9. Known prenylflavonoids isolated from *E. Herba*.



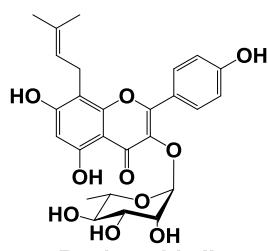
Epimedoside E



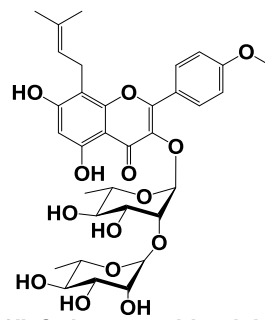
Ikariside F



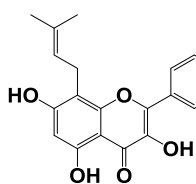
Icariside II



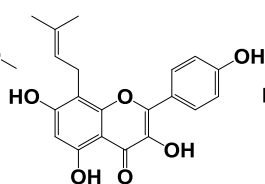
Baohuoside II



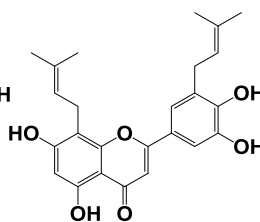
2''-O-rhamnosyl-icarisid II



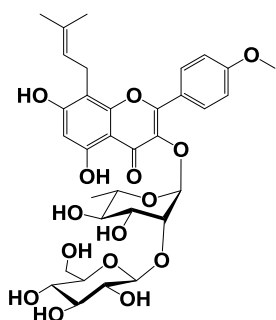
Icaritin



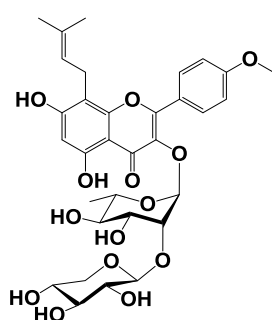
Desmethylicaritin



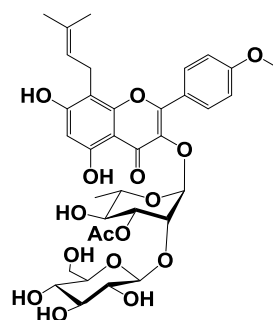
Epimedokoreanin B



Sagittatoside A



Sagittatoside B



Sagittatoside C

Fig. 9. (Continued)

2-3 抽出・分離

2-3-1 イカリソウの CML, CMA 生成阻害活性画分の検討

ウチダ和漢薬より購入したイカリソウ (*Epimedii Herba*) について、先ず、CML, CMA 生成阻害活性画分を検討するために予試験を行った。生薬の成分研究の常法に従い、イカリソウ (10 g) をメタノール抽出し、MeOH 抽出エキス (1.4 g) を得た。MeOH エキスは脱脂を目的として、*n*-Hexane と 80% MeOH で分配した。次に、80% MeOH 分画はポリスチレンゲル (MCI gel CHP20P) に付し、H₂O、50% MeOH および 100% MeOH で順次溶出させた (Chart 1)。MeOH 抽出物とこれら分画について、CML, CMA 生成阻害試験 (サンプル濃度: 1.0 mg/mL) を行った (Fig. 10)。

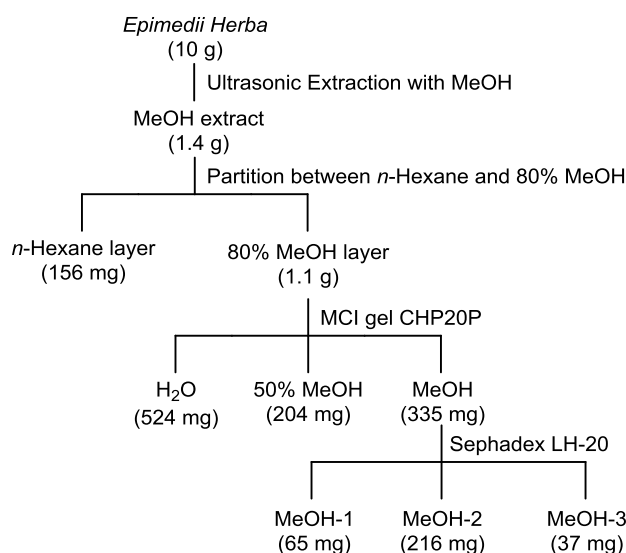


Chart 1.

その結果、CML, CMA 共に MCI gel CHP20P の 50% MeOH, MeOH 溶出分画に強い生成阻害活性が認められた (Fig. 10 a, b)。さらに、50% MeOH 溶出分画よりも収量の多い MeOH 溶出分画については、Sephadex LH-20 による化合物群の分離を行い、TLC により分離様式を確認しながら、3 つ (Frs. 1~3) に分画した。得られた画分について CML, CMA 生成阻害活性試験 (サンプル濃度: 100 µg/mL) を行った (Fig. 10 c, d)。その結果、CML, CMA 共に MeOH-3 画分に強い生成阻害活性が認められた。Fig. 10 において、強い活性のみられた画分について、TLC による分析を行った。その結果、フラボノイドが豊富に含まれていることが判明した。そこで、CML, CMA 生成を阻害するフラボノイド成分の詳細を明らかにするために、原料を 3 kg に増量し、本格的な抽出・分離を開始した。

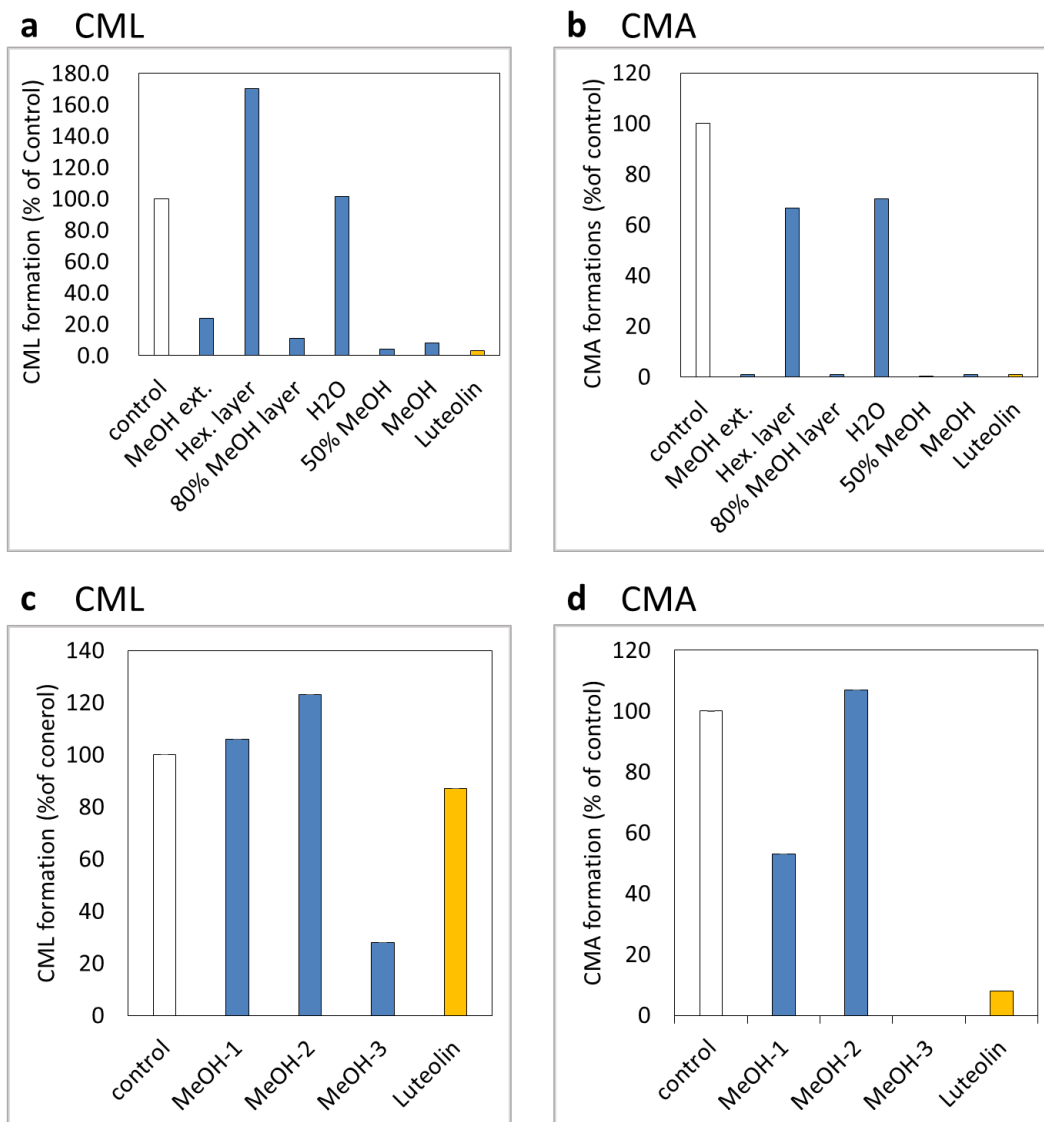


Fig. 10. Effect of divided fractions on CML (a, b) & CMA (c, d) formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with fractions (a, b: 1.0 mg/mL, c, d: 100 µg/mL) at 37°C for 7 days. The CML and CMA content was determined using noncompetitive ELISA.

2-3-2 イカリソウ由来フラボノイドの抽出・分離

イカリソウ (*E. Herba*) の CML, CMA 生成阻害作用を発現する活性本体とみられるフラボノイド化合物を詳細に検討するために、再度、イカリソウ (3.0 kg) の抽出・分離を行った。得られた MeOH エキスは、前節 (2-3-1) と同様の分離スキームで主要フラボノイド画分 2、3 (Frs. 2 and 3) を得た。これらの画分は、更に MCI gel CHP20P に付し、再分画を行った。得られた小分画のフラボノイド含有画分について、それぞれ各種カラムクロマトグラフィーを用いて繰り返し分離・精製を行い、化合物 **1~46** と仮称する 46 個の化合物を単離した (Chart 2)。

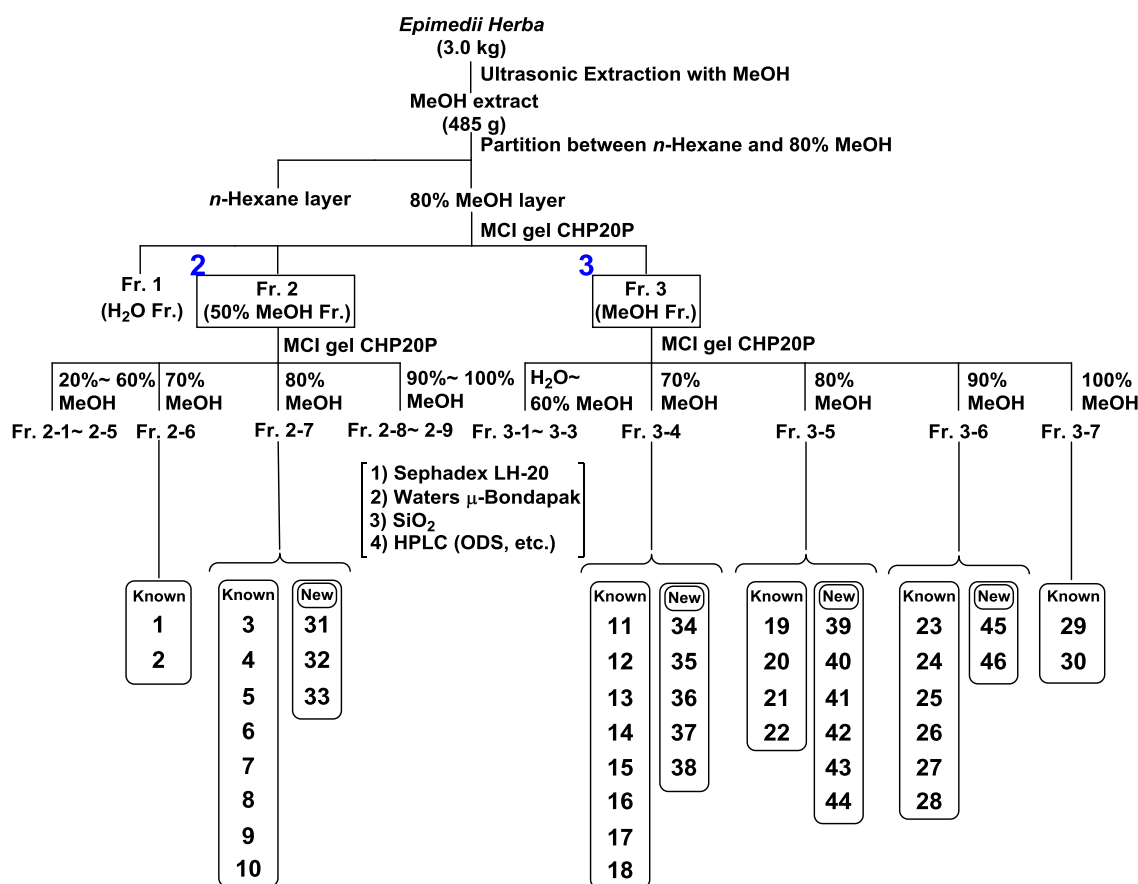


Chart 2.

得られた化合物のうち、化合物 **1~30** は既知成分であった。一方、化合物 **31~46** の 16 個は文献未掲載の新規化合物であった。次節では化合物 **1~46** の化学構造について、新規化合物を中心に詳しく説明する。

2-4 構造解析

前節で概要を記したように、各種カラムクロマトを効果的に組み合わせて精製を行い、イカリソウから 46 種類の化合物を単離した。得られた化合物のうち、化合物 **1~30** は既知化合物と同定され、化合物 **31~46** は新規化合物と決定された。

2-4-1 イカリソウ由来フラボノイドの既知化合物の構造について

得られた化合物のうち、既知化合物(**1~30**)の化学構造については、主に $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ を測定し、文献値と比較することで同定を行った (Fig. 11)。

化合物 **3~5** は、イカリソウの代表的な既知成分である icariin (**12**) にもう 1 mol 糖が結合した化合物である。即ち、icariin の C 環 3 位のラムノースの 2 位にそれぞれグルコース、ラムノース、キシロースが結合した 3 糖配糖体で、それぞれ epimedin A (**3**)、B (**4**)、C (**5**) と同定した^{50,51}。化合物 **6** は icariin の C 環 3 位のラムノースの 3 位にグルコースが結合した epimedin I と同定した^{47,52}。化合物 **7~10** は epimedin I (**6**) を、化合物 **19** は epimedin I (**6**) の A 環 7 位のグルコースが解離した 2 糖配糖体を基本骨格とし、末端グルコースの水酸基の一部がアセチル化されているのが特徴である。即ち、末端グルコースの 2, 6 位アセチル体の epimedin K (**7**)、3, 6 位アセチル体の epimedin L (**8**)、4, 6 位アセチル体の caohuoside B (**9**)、6 位アセチル体の epimedokoreanoside I (**10**) とその 2 糖配糖体 korepimodoside A (**19**) と同定した^{52,53}。化合物 **2**、**12~14** は 3 位水酸基、8 位プレニル基を共有する 2 糖配糖体で、それぞれ cuhuoside (**2**)⁵²、icariin (**12**)⁵³、sagittatoside A (**13**)⁵⁴、2''-O-rhamnosyl icarisid II (**14**)⁵⁵ と同定した。化合物 **1**、**15~18**、**21** は C 環 3 位にラムノース、もしくは A 環 7 位にグルコースが結合した 1 糖配糖体で、それぞれ epimedeside C (**1**)⁵⁶、pherodendroside (**15**)⁵⁶、caohuoside C (**16**)⁵²、icariside II (**17**)⁵³、icarisoside A (**18**)⁵⁶、icariside I (**21**)⁵³ と同定した。化合物 **11**、**20**、**22~30** はプレニルフラボノイドのアグリコンで、それぞれ epimedokoreanin C (**11**)⁵⁷、8-prenyl kaempferol (**20**)⁵⁸、8-prenyl luteolin (**22**)⁵⁸、gaocaonin E (**23**)⁵⁹、euchresta flavanone A (**24**)⁵⁹、epimedinonin C (**25**)⁶⁰、8,5'-diprenyl apigenin (**26**)⁶¹、broussonol D (**27**)⁶¹、epimedokoreanin B (**28**)⁵⁷、4'-O-methyl limonianin (**29**)⁶²、limonianin (**30**)⁶² と同定した。

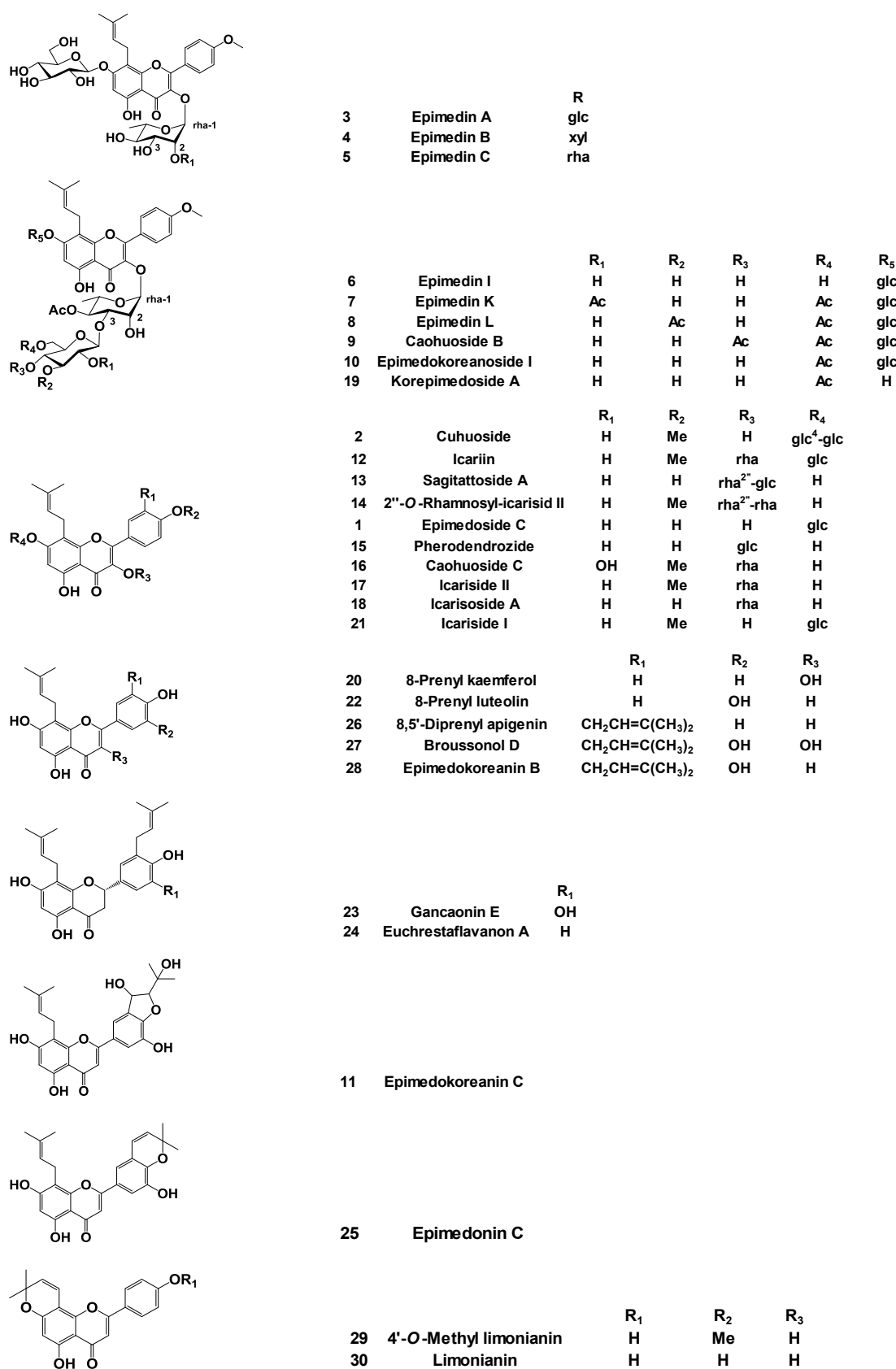


Fig. 11. Known compounds isolated from *Epimedium Herba*.

2-4-2 イカリソウ由来新規化合物の構造決定

2-4-2-1 Icarinoside A (31), B (32), C (39) の構造決定

(1) Icarinoside A (31)

化合物 **31** は $[\alpha]_D -71.9^\circ$ ($c=0.20$) の淡黄色粉末として得られ、HR-ESI-MS の結果より、 m/z 903.2896 $[M+Na]^+$ (Calcd for 903.2899) で組成式は $C_{41}H_{52}O_{21}$ と推定された。 1H -NMR のデータ (Table 2) より、化合物 **31** はプレニルフラボノイド配糖体と推定された。即ち、フラボノール骨格のB環がAA'XX'型に配位した際に特徴的なアロマティックプロトンである δ 8.11 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 7.18 (2H, d, $J=8.6$ Hz)、また、 γ,γ -dimethylallyl 構造 (プレニル基) に特徴的なシグナルである 11位、12位、14位、15位のシグナル δ 3.82, 3.68 (each 1H, m), 5.50 (1H, t, $J=7.4$ Hz), 1.75 (3H, s), 1.58 (3H, s) がそれぞれ観測された。さらに、A環に由来するアロマティックプロトンが δ 6.88 (1H, s) に、メトキシ基に由来するシグナルが3本 δ 3.79 (3H, s), 3.74 (3H, s), 3.75 (3H, s) に観測された。また、 δ 6.10 (1H, br s) に α -L-ラムノースのアノメリックプロトン、 δ 5.71 (1H, d, $J=7.5$ Hz) に β -D-グルコースのアノメリックプロトンがそれぞれ観測された。以上のスペクトルデータより、化合物 **31** はイカリソウ由来の epimedin C (**5**) のデータと類似することが判明した。ただし、epimedin C (**5**) の末端ラムノースのシグナルが消失し、新たに、 δ 5.78 (1H, d, $J=2.9$ Hz) にヘミアセターナルプロトン、 δ 5.16 (1H, d, $J=2.9$ Hz), 5.02 (1H, q, $J=6.8$ Hz) に酸素原子に隣接したメチンプロトン、 δ 1.51 (3H, d, $J=6.8$ Hz) にダブルットメチルのシグナルが観測された。これらのプロトンシグナルを手がかりに、さらに詳細なスペクトル解析を行うために、各種 2D-NMR を測定した。まず、HMQC の結果より、上述したプロトンシグナルに対応する ^{13}C -NMR のデータはそれぞれ δ 105.0, 73.5, 71.9, 18.8 に帰属された。また、 1H -NMR のカップリングパターンと 1H - 1H COSY の結果より、 δ 5.78 と δ 5.16 のプロトン、 δ 5.02 と δ 1.51のプロトンは隣接することが判明した。HMBC にて、 δ 5.78 から δ 80.2, 73.5, 71.9、 δ 5.16 から δ 172.0、 δ 5.02 から δ 105.0、 δ 1.51 から δ 105.0 に相関が観測された。さらに、HMBC の相関より δ 172.0, 173.4 のカルボキシル基はメチルエステル化されていることも判明した。さらに δ 80.2 はフラボン骨格のC-3 位に結合したラムノースの 2 位に帰属されることから、部分構造 A: Methyl 2-hydroxy-3-[(1-methoxy-1-oxopropan-2-yl) oxy] propanoate はラムノース 2 位に結合していることが判明した (Fig.12 (a))。

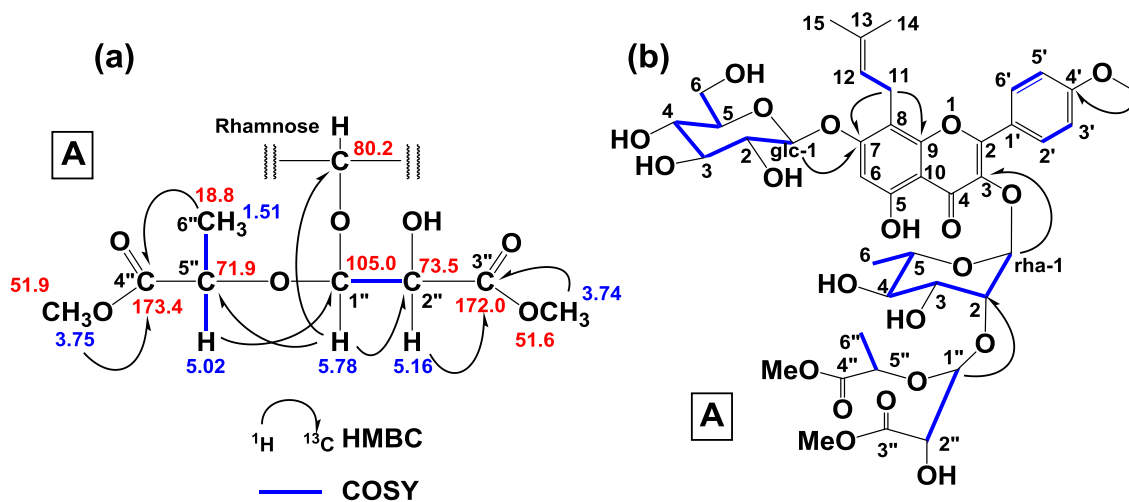


Fig. 12. (a) Partial structure A of 31, (b) Full structure of 31.

部分構造 A は、epimedinin C の末端ラムノースが C-3'', 4''間で開裂したことにより生成したものと推察される。したがって、epimedinin C の末端の α -L-ラムノースの配置が保持されていると仮定すると、C-1'', 2'', 5''位の立体化学はそれぞれ *S*, *S*, *R* 体であると予想される。また、C-3'', C-4'' のカルボニル基がメチルエステルになっている由来は、抽出溶媒のメタノールの可能性がある。以上のデータを総合し、化合物 31 の構造は Fig 12 (b) に示されるように推定した。文献検索の結果、本化合物は論文未掲載の新規化合物であることから、**icarinin A** と命名した。

(2) Icarin B (32)

化合物 32 は $[\alpha]_D -99.17^\circ$ ($c=0.51$) の淡黄色粉末として得られ、HR-ESI-MS の結果、 m/z 903.2896 $[M+Na]^+$ (Calcd for 903.2899) で組成式は $C_{41}H_{52}O_{21}$ と推定された。また、¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータ (Table 2) より、化合物 31 類縁の epimedinin C 関連化合物であると推定された。Icarin A (31) と 32 のスペクトルデータを詳細に比較すると、フラボン骨格C-3 位のラムノースの 2 位に結合した末端構造が、31 の部分構造 A と異なる以外はよく一致した。化合物 32 の末端部分構造 B に関して、¹H-NMR において、 δ 5.94 (1H, s), 2.63 (1H, dd, $J=6.8, 15.4$ Hz), 2.89 (1H, dd, $J=6.8, 13.2$ Hz), 4.60 (1H, ddd, $J=13.2, 15.4, 6.3$ Hz), 1.50 (3H, d, $J=6.3$ Hz) に特徴的なシグナルが観測された。これらプロトンを起点として、各種 2D-NMR を測定したところ、Fig. 13 (a) に示すような相関が観測された。即ち、 δ 5.94 のヘミアセターールプロトンから δ 79.4, 168.3, 71.8 の炭素、 δ 2.64, 2.89 のメチレンプロトンから δ 171.3, 71.8, 22.0 の炭素にHMBC の相関がみられることから、C-1'' (δ 100.6) のヘミアセターール構造の隣にカルボニル基 (δ 168.3)、ダブルットメチル基 (δ 22.0) の結合したオキシメチレン炭素 (δ 71.8) にメチレン炭素 (δ 41.7) が結合し、そのメ

チレン炭素にカルボニル炭素 (δ 171.3) が結合していることが判明した。また、C-2'', 3'' のカルボニル基はメチルエステルになっていることも HMBC の相関で明らかとなった。以上より、ラムノースの 2 位に結合している部分構造 B は Fig. 13 (a) のように決定された。本化合物は epimedin C の末端ラムノースの C-2'', 3'' 間で酸化的に C-C 結合の開裂が起こったことにより、開環構造をとった後、C-4'' の還元と C-2'', 3'' のカルボン酸部分のメチルエステル化が起こり生成したものと推定している。これらのデータを総合し、化合物 32 の化学構造は、Fig. 13 (b) に示されるように推定した。文献検索の結果、本化合物は論文未掲載の新規化合物であることから、**icarinoside B** と命名した。

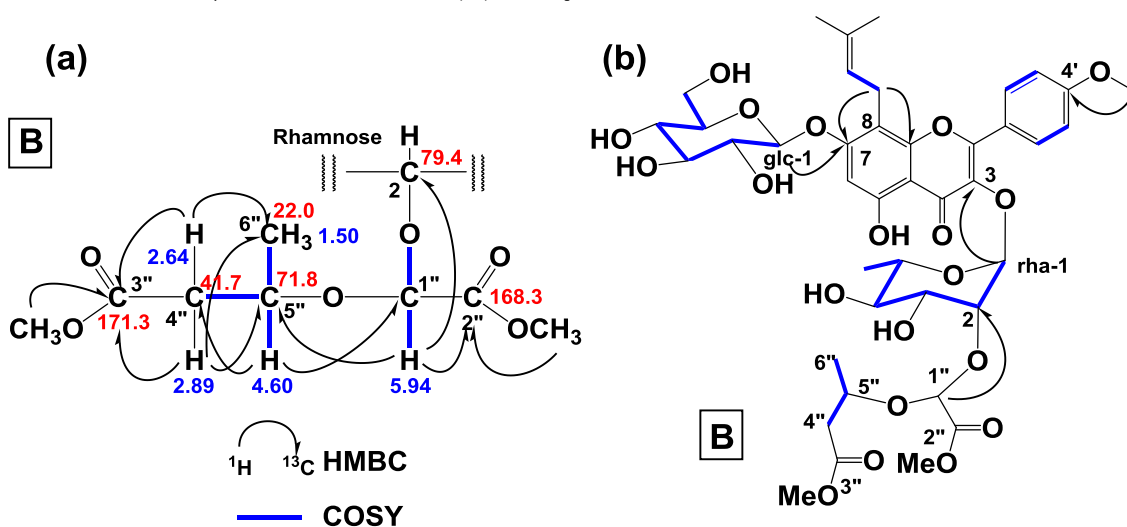


Fig. 13. (a) Partial structure B of 32, (b) Full structure of 32.

(3) Icarinoside C (39)

化合物 **39** は $[\alpha]_D -64.7^\circ$ ($c=0.31$) の淡黄色粉末として得られHR-ESI-MS の結果、 m/z 702.2539 $[M+Na]^+$ (Calcd for 702.2524) で組成式は $C_{35}H_{42}O_{15}$ と推定された。このことから化合物 **39** は icarinoside A (**31**)、B (**32**) と比較して、ヘキソース 1 mol 分、分子量が小さい化合物と判明した。 1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータ (Table 2-1) を、icarinoside B (**32**) と比較すると、7 位に結合するグルコース由来のシグナルが無くなったこと以外よく一致した。したがって、化合物 **39** は、2''-*O*-rhamnosyl-icarinosid II (**14**) の末端ラムノースが C-2'', C-3'' 位間で酸化的に開裂した Fig. 14 に示す構造であると推定した。本化合物は新規化合物であることから、**icarinoside C** と命名した。

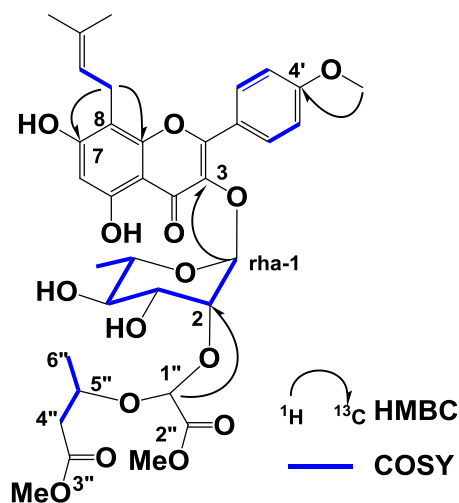


Fig. 14. Key HMBC & 1H - 1H COSY correlations of **39**.

Table 2. ¹H- and ¹³C-NMR data for icarinoside A (31), B (32), and C (39) in pyridine-*d*₅.

position	Icarinoside A (31)		Icarinoside B (32)		Icarinoside C (39)	
	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)
2	157.5		157.4		156.9	
3	135.0		135.0		135.0	
4	179.0		178.8		178.7	
5	160.0		159.8		159.9	
6	99.1	7.22, 1H, s	98.9	7.19, 1H, s	98.9	6.88, 1H, s
7	161.7		161.4		161.8	
8	109.4		109.2		106.8	
9	153.8		153.5		154.6	
10	106.7		106.5		105.0	
11	22.3	3.82,3.68, 1H, m	22.5	3.82,3.68, 1H, m	21.9	3.77, 1H, m
12	123.6	5.50, 1H, t, (7.4)	122.8	5.51, 1H, t, (7.4)	123.1	5.51, 1H, t, (7.4)
13	131.5		131.3		131.5	
14	25.5	1.75, 3H, s	25.3	1.75, 3H, s	25.4	1.79, 3H, s
15	17.9	1.58, 3H, s	17.7	1.58, 3H, s	17.7	1.63, 3H, s
1'	123.6		123.0		123.0	
2'	131.5	8.11, 1H, d, (8.6)	130.8	8.11, 1H, d, (8.5)	130.8	8.10, 1H, d, (8.6)
3'	114.2	7.18, 1H, d, (8.6)	114.2	7.18, 1H, d, (8.6)	114.2	7.16, 1H, d, (8.6)
4'	162.5		161.9		163.0	
5'	114.2	7.18, 1H, d, (8.6)	114.2	7.18, 1H, d, (8.6)	114.2	7.16, 1H, d, (8.6)
6'	131.5	8.11, 1H, d, (8.6)	130.8	8.11, 1H, d, (8.5)	130.8	8.10, 2H, d, (8.6)
4'-OMe	55.4	3.76, 3H, s	55.2	3.75, 3H, s	55.2	3.76, 3H, s
1''	105.0	5.78, 1H, d, (2.9)	100.6	5.94, 1H, s	101.7	5.92, 1H, s
2''	73.5	5.16, 1H, d, (2.9)	168.3		79.6	
3''	172.0		171.3		71.8	
4''-1	173.4		41.7	2.63, 1H, dd, (6.8, 15.4)	72.4	2.59, 1H, dd, (5.7, 15.5)
4''-2				2.89, 1H, dd, (6.8, 13.2)		2.86, 1H, dd, (6.9, 15.5)
5''	71.9	5.02, 1H, q, (6.3, 13.2)	71.8	4.60, 1H, m	71.5	4.62, 1H, m
6''	18.8	1.51, 3H, d, (6.8)	22.0	1.50, 1H, d, (6.3)	17.8	1.41, 1H, d, (6.3)
2''-OMe			51.5	3.66, 3H, s	51.5	3.62, 3H, s
3''-OMe	51.6	3.74, 3H, s	51.2	3.64, 3H, s	51.2	3.61, 3H, s
4''-OMe	51.9	3.75, 3H, s				
rha						
1	101.8	6.10, 1H, br s	101.6	6.11, 1H, br s	101.7	6.09, 1H, br s
2	80.0	5.07, 1H, br s	79.4	5.03, 1H, br s	79.6	5.03, 1H, br s
3	71.5	4.55, 1H, dd, (3.5, 9.5)	71.7	4.57, 1H, dd, (3.5, 9.2)	71.8	4.57, 1H, dd, (3.4, 9.7)
4	72.8	4.17, 1H, t, (9.5)	72.3	4.22, 1H, t, (9.2)	72.4	4.20, 1H, t, (9.7)
5	72.1	4.00, 1H, m	71.4	4.00, 1H, m	71.5	4.07, 1H, m
6	17.9	1.36, 3H, d, (6.3)	17.7	1.36, 3H, d, (5.7)	17.8	1.32, 3H, d, (6.3)
glc						
1	102.3	5.71, 1H, d, (7.5)	102	5.70, 1H, d, (7.5)		
2	74.6	4.36, 1H, dd, (7.5, 9.7)	74.3	4.36, 1H, br d, (8.6)		
3	78.2	4.38, 1H, t, (9.7)	77.9	4.38, 1H, t, (8.6)		
4	70.8	4.30, 1H, dd, (9.7, 9.2)	70.6	4.30, 1H, dd, (8.0, 8.6)		
5	78.7	4.12, 1H, m	78.4	4.12, 1H, m		
6	61.9	4.43, 1H, m	61.7	4.33, 1H, m		
		4.49, 1H, br d, (9.7)		4.49, 1H, br d, (9.7)		

2-4-2-2 Koreanoside F (34), G (37), H (38), I (33) の構造決定

(4) Koreanoside F (34)

化合物 **34** は $[\alpha]_D -203.7^\circ$ ($c = 0.16$) の淡黄色粉末として得られ、HR-ESI-MS の結果、 m/z 551.1508 $[M+Na]^+$ (Calcd for 551.1529) で組成式は $C_{27}H_{28}O_{11}$ と推定された。 1H -NMR において (Table 3)、フラボノール骨格の B 環が AA'XX'型に配位した際に特徴的なアロマティックプロトンである δ 8.17 (2H, d, $J = 8.6$ Hz)、7.15 (2H, d, $J = 8.6$ Hz)、と A 環由来のアロマティックプロトン δ 7.11 (1H, s) が観測された。さらに、メトキシ基に由来のシグナル δ 3.73 (3H, s) とラムノースのアノメリックプロトンシグナル δ 6.25 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) も観測され、イカリソウの代表的な成分の icariside II (**17**) のような特徴的なピークが確認された。これらのスペクトルデータより、化合物 **34** は icariside II (**17**) の 8 位プレニル基が酸化された誘導体と推定された。そこで、プレニル基由来のシグナルをみてみると、 1H -NMR において、 δ 7.19 (1H, s) にオレフィニックプロトン、 δ 1.87 (6H, s) にシングレットメチル基 2 本分のシグナルが、 ^{13}C -NMR において δ 97.3, 165.0 にオレフィニック炭素、 δ 68.1 に酸素官能基のついた 4 級炭素、 δ 29.1 にメチル基に由来する炭素が観測された。オレフィニック炭素のうち、一方が δ 165.0 と低磁場に観測されることから、プレニル基はフラボノイドの酸素原子とフラン環を形成していることが推察された。詳細な化学構造を検討するために、各種 2D-NMR のデータを解析すると、 δ 7.19 のオレフィニックプロトンからフラボノイド骨格の C-7 (δ 157.9), C-9 (δ 149.0) の炭素、 δ 1.87 のメチル基より C-12 (δ 165.0), C-14, 15 (δ 29.1) の炭素に相関が観測された。したがって、プレニル基はフラボノイドの 8 位に結合し、7 位の水酸基と 12 位でフラン環を形成し、13 位の炭素にはメチル基 2 本と水酸基 1 本が結合した 2-(furan-2-yl) propan-2-ol 構造をとることが判明した。以上のデータを総合して、化合物 **34** は Fig. 15 に示す構造と決定した。本化合物は新規化合物であることから、**koreanoside F** と命名した。

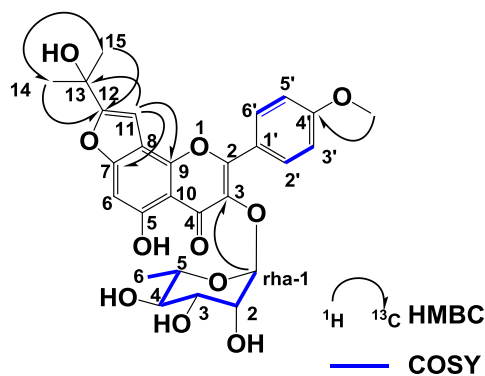


Fig. 15. Key HMBC & 1H - 1H COSY correlations of **34**.

(5) Koreanoside I (33)

化合物 **33** は $[\alpha]_D -202.3^\circ$ ($c=0.15$) の淡黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果、 m/z 683.1945 $[M+Na]^+$ (Calcd for 683.1945) で組成式は $C_{32}H_{36}O_{15}$ と推定された。MS のデータから、化合物 **33** は koreanoside F (**34**) と比較してペントース 1 mol 分 (m/z 132)、分子量が大きい化合物と判明した。化合物 **33** を酸加水分解し、得られた糖画分を旋光度検出器に接続した HPLC で分析したところ、L-ラムノースとともに D-キシロースのピークを観測することができた。 ^{13}C -NMR のデータ (Table 3) を koreanoside F (**34**) と比較すると、キシロース由来のシグナル (δ 107.5, 75.0, 77.8, 70.4, 68.1) が増えていること以外よく一致した。そこでキシロースの結合位置を決定するために、各種 2D-NMR の解析を行ったところ、キシロースのアノメリックプロトン δ 5.13 (1H, d, $J=7.4$ Hz) とラムノース 2 位の炭素 (δ 81.6) に HMBC の相関が観測された。以上のことから、化合物 **33** は koreanoside F (**34**) のラムノース 2 位にキシロースが結合した Fig. 16 のような構造であると決定した。本化合物は新規化合物であることから、**koreanoside I** と命名した。

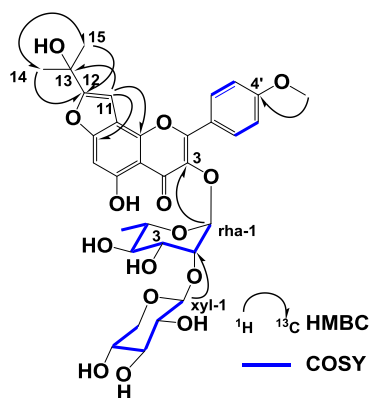


Fig. 16. Key HMBC & 1H - 1H COSY correlations of **33**.

(6) Koreanoside G (37)

化合物 **37** は $[\alpha]_D -204.1^\circ$ ($c=0.17$) の淡黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果、 m/z 565.1743 $[M+Na]^+$ (Calcd for 565.1686) で組成式は $C_{28}H_{30}O_{11}$ と推定された。化合物 **37** は koreanoside F (**34**) と比較して 14 マスユニット分子量が大きく、 1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータ (Table 4) が、よく一致するものの、化合物 **37** にはメトキシ基に由来するシグナル δ 3.18 (3H, s)、および δ 50.5 が観測された。そこで、このメトキシ基の結合位置を決定するために、各種 2D-NMR を測定した。その結果、メトキシ基のプロトン (δ 3.18) と 13 位の炭素 δ 73.1 に HMBC の相関がみられた。よって、化合物 **37** は koreanoside F (**34**) の 13 位にメトキシ基が結合した Fig. 17 のような構造であると決定し、**koreanoside G** と命名した。

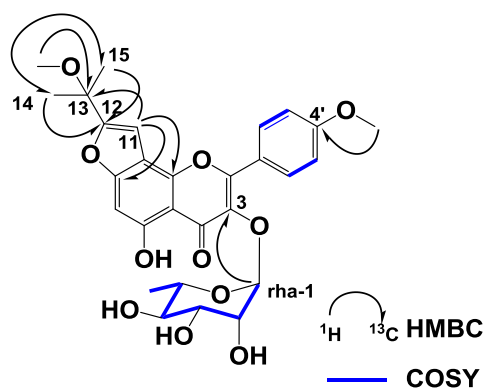


Fig. 17. Key HMBC & ^1H - ^1H COSY correlations of 37.

(7) Koreanoside H (38)

化合物 **38** は $[\alpha]_D -204.1^\circ$ ($c = 0.15$) の淡黄色粉末として得られ、HR-ESI-MS の結果、 m/z 533.1461 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calcd for: 533.1448) で組成式は $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ と推定された。 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータ (Table 4) において、koreanoside F (**34**), G (**37**) と類似したプレニルフラボノイドのフラン環誘導体と判明したが、メチル基部分のシグナルが異なって観測された。即ち、化合物 **38** の ^1H -NMR において δ 5.29, 5.89 (each 1H, s) にエキソメチレンプロトン、 δ 2.17 (3H, s) にビニルメチルプロトンのシグナルが、 ^{13}C -NMR において δ 113.7, 132.7 に 2 置換オレフィン、 δ 19.1 にビニルメチル基のシグナルがみられた。そこで詳細な構造を決定するために各種 2D-NMR を測定したところ、エキソメチレンプロトン δ 5.29, 5.89 から C-12 (δ 156.9)、C-15 (δ 19.1) の炭素に、ビニルメチルプロトン δ 2.17 から C-12 (δ 156.9)、C-14 (δ 113.7) の炭素に HMBC 相関が観測されることより、化合物 **38** のプレニル基部分の構造は、2-(prop-1-en-2-yl) furan であると判明した。以上のデータにより、化合物 **38** は、koreanoside F (**34**), G (**37**) の水酸基が脱水し二重結合が形成した Fig. 18 に示すような構造と決定した。化合物 **38** は新規化合物であるため、koreanoside H と命名した。

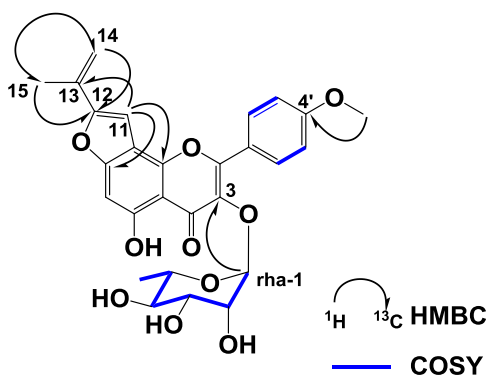


Fig. 18. Key HMBC & ^1H - ^1H COSY correlations of 38.

Table 3. ¹H- and ¹³C-NMR data for koreanoside I (33) and F (34) in pyridine-*d*₅.

position	Koreanoside I (33)		Koreanoside F (34)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
2	157.1		157.1	
3	133.0		133.7	
4	179.5		179.5	
5	160.2		160.2	
6	94.8	7.11, 1H, s	94.7	7.11, 1H, s
7	158.9		157.9	
8	106.2		106.2	
9	149.0		149.0	
10	109.7		109.7	
11	97.3	7.18, 1H, s	97.3	7.19, 1H,s
12	165.0		165.0	
13	67.1		68.1	
14	29.1	1.86, 3H, s	29.1	1.87, 3H, s
15	29.1	1.86, 3H, s	29.1	1.87, 3H, s
1'	122.9		122.9	
2'	131.0	8.14, 1H, d, (9.2)	130.5	8.17, 1H, d (8.6)
3'	114.4	7.17, 1H, d, (9.2)	114.3	7.15, 1H, d, (8.6)
4'	162.1		162.0	
5'	114.4	7.17, 1H, d, (9.2)	114.3	7.15, 1H, d, (8.6)
6'	131.0	8.14, 1H, d, (9.2)	130.5	8.17, 1H, d (8.6)
4'-OMe	55.3	3.73, 3H, s	55.2	3.73, 3H, s
13-OMe				
rha				
1	102.4	6.28, 1H, br s	103.5	6.25, 1H, d, (1.8)
2	81.6	4.98, 1H, br s	71.4	5.07, 1H, t, (1.8)
3	71.8	4.61, 1H, dd, (3.5, 9.2)	71.9	4.59, 1H, dd, (3.5, 9.7)
4	73.0	4.19, 1H, t, (9.2)	72.6	4.28, 1H, t, (9.7)
5	71.5	4.24, 1H, m	71.8	4.05, 1H, m
6	17.8	1.37, 3H, d, (6.3)	17.9	1.38, 3H, d, (6.3)
xyl				
1	107.5	5.13, 1H, d, (7.4)		
2	75.0	4.02, 1H, dd, (7.4, 7.5)		
3	77.8	4.12, 1H, m		
4	70.4	3.62, 1H, t, (6.5)		
5	68.1	4.21, 4.12, each 1H, m		

Table 4. ¹H- and ¹³C-NMR data for koreanoside G (37) and H (38) in pyridine-*d*₅.

position	Koreanoside G (37)		Koreanoside H (38)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
2	157.2		157.7	
3	133.7		136.6	
4	179.4		179.7	
5	160.2		159.1	
6	94.7	7.07, 1H, s	94.9	6.84, 1H, s
7	158.9		159.1	
8	107.8		110.7	
9	158.3		156.9	
10	109.1		108.1	
11	101.1	7.16, 1H, s	100.5	7.27, 1H, s
12	159.8		156.9	
13	73.1		132.7	
14	25.0	1.71, 3H, s	113.7	5.29, 5.89, each 1H, s
15	25.0	1.71, 3H, s	19.1	2.17, 3H, s
1'	122.9		122.9	
2'	131.0	8.22, 1H, d, (8.6)	131.4	8.29, 1H, d, (8.6)
3'	114.3	7.15, 1H, d, (8.6)	114.8	7.27, 1H, d, (8.6)
4'	162.0		162.0	
5'	114.3	7.15, 1H, d, (8.6)	114.8	7.27, 1H, d, (8.6)
6'	131.0	8.22, 1H, d, (8.6)	131.4	8.29, 1H, d, (8.6)
4'-OMe	55.2	3.73, 3H, s	55.7	3.82, 3H, s
13-OMe	50.5	3.18, 3H, s		
rha				
1	103.5	6.24, 1H, br s	103.8	6.23, 1H, d, (1.8)
2	72.5	5.06, 1H, br s	72.1	5.12, 1H, t, (1.8)
3	71.8	4.57, 1H, dd, (3.5, 9.8)	72.1	4.63, 1H, dd, (3.5, 9.7)
4	71.3	4.26, 1H, t, (9.8)	72.8	4.32, 1H, t, (9.7)
5	71.9	4.03, 1H, m	71.7	4.09, 1H, m
6	17.9	1.36, 3H, d, (6.3)	18.2	1.41, 3H, d, (6.3)

2-4-2-3 Korepimodoside D (40), E (41), F (42) の構造決定

(8) Korepimodoside D (40)

化合物 **40** は $[\alpha]_D -72.9^\circ$ ($c=0.56$) の淡黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果、 m/z 825.2606 $[M+Na]^+$ (Calcd for 825.2582) で組成式は $C_{39}H_{46}O_{18}$ と推定された。化合物 **40** を酸加水分解し、得られた糖画分を旋光度検出器に接続した HPLC で分析したところ、L-ラムノースとともに D-グルコースのピークを観測することができた。 1H -NMR において (Table 5)、イカリソウの典型的なフラボノイドである icariin 由来のシグナルがみられた。即ち、B 環が AA'XX' 型プロトンである δ 8.16 (2H, d, $J=6.8$ Hz), 8.25 (2H, d, $J=6.8$ Hz)、 γ,γ -dimethylallyl 基 (プレニル基) のシグナル δ 4.19, 4.08 (each 1H, m), 5.54 (1H, t, $J=6.9$ Hz), 1.79 (3H, s), 1.63 (3H, s)、A 環由来のプロトン δ 6.88 (1H, s)、メトキシ基のプロトン δ 3.79 (3H, s) がみられた。また、 δ 6.00 (1H, br s) に α -L-ラムノースのアノメリックプロトン、 δ 5.09 (1H, d, $J=8.0$ Hz) に β -D-グルコースのアノメリックプロトンがそれぞれ観測された。 ^{13}C -NMR においても (Table 5)、icariin に類似したピークが観測された。アグリコン部と糖部の結合位置について、各種 2D-NMR の解析を行ったところ (Fig. 19)、ラムノースのアノメリックプロトン (δ 6.00) は C 環 3 位 (δ 135.2) に、またグルコースのアノメリックプロトン (δ 5.09) は、ラムノースの 3 位 (δ 79.2) に HMBC の相関が観察された。このことから、化合物 **40** は、C 環 3 位にラムノースが、さらに、そのラムノースの 3 位にグルコースが結合した korepimodoside A (**19**) を基本ユニットとする 2 糖配糖体であることが判明した。さらに、化合物 **40** はアセチル基のシグナルが 3 本 (δ 2.18, 2.15, 2.03) 観測されることから、その結合位置を確定するために、各種 2D-NMR の解析を行った (Fig. 19)。その結果、ラムノースの 4 位 (δ 5.71)、グルコースの 2 位 (δ 5.43)、6 位 (δ 4.60, 4.86) がアシレーションシフトにより大幅に低磁場に観測されること、並びに、それらプロトンから δ 170.7, 170.5, 170.6 のカルボニル炭素に HMBC の相関がみられることから、3 本のアセチル基はラムノースの 4 位、グルコースの 2、6 位に結合していると決定した。以上のデータにより、化合物 **40** は Fig. 19 に示す構造と決定され、アシル基の結合位置の違いが特徴的な新規化合物として、korepimodoside **D** と命名した。

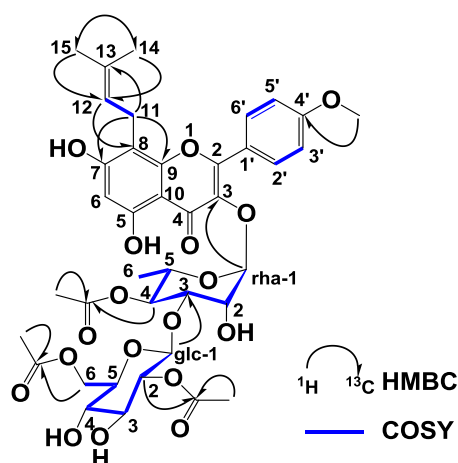


Fig. 19. Key HMBC & ^1H - ^1H COSY correlations of **40**.

(9) **Korepimedeside E (41)**

化合物 **41** は $[\alpha]_{\text{D}} -71.9^\circ$ ($c=0.23$) の淡黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果、 m/z 825.2606 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calcd for 825.2582) で組成式は $\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{O}_{18}$ と推定された。また、 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータ (Table 5) より、化合物 **41** は、 δ 2.03, 2.07, 2.15 にアセチル基由来のシグナルが観測され、korepimedeside D (**40**) と同様に、korepimedeside A (**19**) 関連プレニルフラボノイドの糖部に 3 本のアセチル基が結合した構造と推定された。アセチル基の結合位置に関しては、各種 2D-NMR を測定した結果、ラムノースの 4 位 (δ 5.81)、並びに、グルコースの 3 位 (δ 5.71)、6 位 (δ 4.67, 4.86) が低磁場にアシレーションシフトしていること、さらにそれらプロトンから δ 170.5, 170.6, 170.7 のカルボニル炭素に HMBC の相関が観測されることから決定した。以上のデータにより、化合物 **41** の構造式は Fig. 20 に示すような構造と決定し、**korepimedeside E** と命名した。

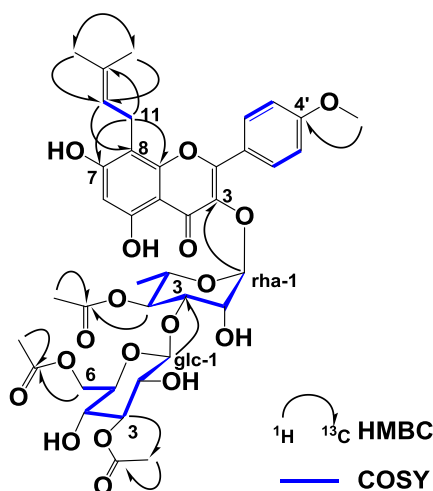


Fig. 20. Key HMBC & ^1H - ^1H COSY correlations of **41**.

(10) **Korepimodoside F (42)**

化合物 **42** は $[\alpha]_D -73.1^\circ$ ($c=0.22$) の淡黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果、 m/z 825.2606 $[M+Na]^+$ (Calcd for 825.2582) で組成式は $C_{39}H_{46}O_{18}$ と推定された。また、 1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータ (Table 5) より、本化合物も、korepimodoside D (**40**), E (**41**) と同様に korepimodoside A (**19**) 関連のアセチル誘導体と推定された。 1H -NMR において、 δ 2.03, 2.11, 2.24 に 3 本みられるアセチル基の結合位置に関しては、各種 2D-NMR を測定した結果、ラムノースの 4 位 (δ 5.84)、およびグルコースの 4 位 (δ 5.31) と 6 位 (δ 4.35, 4.56) のプロトンがアシレーションシフトにより低磁場に観測されること、さらに、それらプロトンから δ 170.7, 170.5, 170.6 のカルボニル炭素に HMBC の相関が観測されることより、ラムノースの 4 位、およびグルコースの 4 位と 6 位に結合していると決定された。以上のデータにより、化合物 **42** の構造式は Fig. 21 に示すように決定し、新規化合物であることから **korepimodoside F** と命名した。

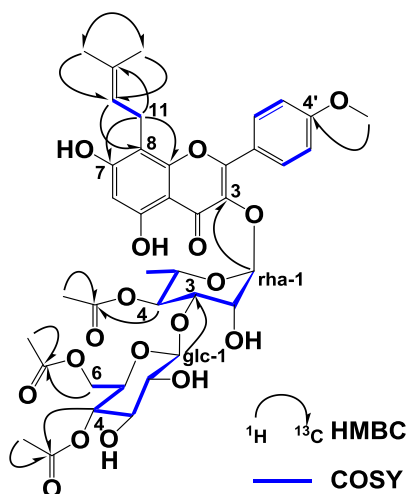


Fig. 21. Key HMBC & 1H - 1H COSY correlations of **42**.

Table 5. ¹H- and ¹³C-NMR data for korepimodoside D (40), E (41), and F (42) in pyridine-*d*₅.

position	Korepimodoside D (40)		Korepimodoside E (41)		Korepimodoside F (42)	
	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)
2	157.9		157.9		157.9	
3	135.2		135.2		135.2	
4	178.7		178.7		178.7	
5	160.2		160.2		160.2	
6	98.9	6.88, 1H, s	98.9	6.87, 1H, s	98.9	6.88, 1H, s
7	161.7		161.7		161.7	
8	105.0		105.0		105.0	
9	153.9		153.9		153.9	
10	106.9		106.9		106.9	
11	21.9	4.08, 4.19, 1H, m	21.9	4.08, 4.19, 1H, m	21.9	4.08, 4.19, 1H, m
12	122.8	5.54, 1H, t, (7.4)	122.8	5.54, 1H, t, (7.4)	122.8	5.54, 1H, t, (7.4)
13	131.2		131.2		131.2	
14	25.4	1.79, 3H, s	25.4	1.80, 3H, s	25.4	1.79, 3H, s
15	17.9	1.63, 3H, s	17.9	1.64, 3H, s	17.9	1.63, 3H, s
1'	122.9		122.9		122.9	
2'	130.8	8.16, 1H, d, (6.8)	130.8	8.16, 1H, d, (6.8)	130.8	8.16, 1H, d, (6.8)
3'	114.3	7.25, 1H, d, (6.8)	114.3	7.25, 1H, d, (6.8)	114.3	7.25, 1H, d, (6.8)
4'	162.4		162.4		162.4	
5'	114.3	7.25, 1H, d, (6.8)	114.3	7.25, 1H, d, (6.8)	114.3	7.25, 1H, d, (6.8)
6'	130.8	8.16, 1H, d, (6.8)	130.8	8.16, 1H, d, (6.8)	130.8	8.16, 1H, d, (6.8)
4'-OMe	55.3	3.79, 3H, s	55.3	3.79, 3H, s	55.3	3.79, 3H, s
rha						
1	102.9	6.00, 1H, br s	102.9	6.11, 1H, br s	102.9	6.09, 1H, br s
2	69.2	5.01, 1H, br s	69.2	5.03, 1H, br s	69.2	5.03, 1H, br s
3	79.2	4.59, 1H, dd, (2.9, 9.2)	79.2	4.57, 1H, dd, (3.5, 9.2)	79.2	4.57, 1H, dd, (3.4, 9.7)
4	71.8	5.71, 1H, t, (9.5)	71.8	5.81, 1H, t, (9.2)	71.8	5.84, 1H, t, (9.7)
5	74.4	3.73, 1H, m	74.4	4.00, 1H, m	74.4	4.07, 1H, m
6	17.2	1.12, 3H, d, (6.3)	17.2	1.36, 3H, d, (5.7)	17.2	1.32, 3H, d, (6.3)
4-Ac	170.7, 20.8	2.03, 3H, s	170.7, 20.8	2.15, 3H, s	170.7, 20.8	2.03, 3H, s
glc						
1	105.9	5.09, 1H, d, (8.0)	105.9	5.08, 1H, d, (8.0)	105.9	5.06, 1H, d, (8.1)
2	75.3	5.43, 1H, br d, (9.1)	71.4	3.85, 1H, m	72.8	3.85, 1H, m
3	73.0	4.19, 1H, t, (9.1)	78.4	5.71, 1H, t, (8.6)	73.0	4.18, 1H, t, (9.2)
4	70.9	3.89, 1H, t, (9.1)	70.9	3.94, 1H, m	74.5	5.31, 1H, d, (9.2)
5	70.9	3.73, 1H, m	70.9	4.11, 1H, t, (8.6)	70.9	4.04, 1H, m
6	64.1	4.60, 1H, m	64.1	4.67, 1H, dd, (6.3, 12.0)	64.1	4.56, 1H, dd, (1.7, 11.2)
		4.86, 1H, dd, (1.7, 11.2)		4.86, 1H, d, (12.0)		4.35, 1H, d, (12.0)
2-Ac	170.5, 20.8	2.18, 3H, s				
3-Ac			170.5, 20.8	2.07, 3H, s		
4-Ac					170.5, 20.8	2.24, 3H, s
6-Ac	170.6, 20.8	2.15, 3H, s	170.6, 20.8	2.15, 3H, s	170.6, 20.8	2.11, 3H, s

2-4-2-4 Koreanoside E1 (35), E2 (36) の構造決定

(11) Koreanoside E1 (35)

化合物 **35** は $[\alpha]_D -92.1^\circ$ ($c=0.27$) の淡黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果、 m/z 529.1726 $[M-H]^-$ (Calcd for 529.1726) で組成式は $C_{27}H_{30}O_{11}$ と推定された。 1H -NMR において (Table 6)、イカリソウ由来の典型的なプレニルフラボノイドの icaraside II (**17**) と類似したデータが得られた。また、 γ,γ -dimethylallyl 基 (プレニル基) に代わって、 δ 3.43 (2H, m), 4.92 (1H, dd, $J=5.6, 12.3$ Hz), 5.24, 4.89 (each 1H, s), 2.00 (3H, s) に 3-methyl-but-3-en-2-ol 基の存在が明らかとなった。さらに、 α -L-ラムノースのアノメリックプロトン δ 6.16 (1H, br s) が観測された。 ^{13}C -NMR において (Table 6)、フラボノール骨格とプレニル基部分 (3-methyl-but-3-en-2-ol) とラムノースの存在が確認できた。それぞれの結合位置を決定するために、各種 2D-NMR の測定を行った。その結果、ラムノースのアノメリックプロトン (δ 6.16) と3位の炭素 (δ 130.5)、プレニル基のメチレンプロトン (δ 3.79) から7、9位の炭素 (δ 164.0, 155.2)、酸素官能基に隣接したメチンプロトン (δ 4.92) から8位の炭素 (δ 105.1) にHMBCの相関がみられることから、化合物 **35** の平面構造を Fig. 22 に示すように決定した。

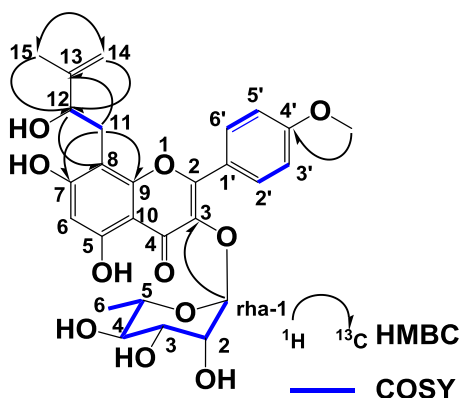


Fig. 22. Key HMBC & 1H - 1H COSY Correlations of **35**.

本化合物のプレニル基12位の二級水酸基は不斉炭素原子であることから、さらに、改良モッシャー法^{63,64}による絶対立体構造の決定を行った。まず、化合物 **35** のラムノースを外してアグリコンを得るために、ナリンギナーゼを用いて酵素加水分解を行った (Fig. 23)。反応液に生じた沈殿物を回収し、シリカゲルで精製することで、アグリコン **35 a** を73%の収率で得た。一方、上清の水溶液 (糖画分) は旋光度計付検出器を用いた HPLC 分析により、構成糖は L-ラムノースと同一と定された (Fig. 23)。

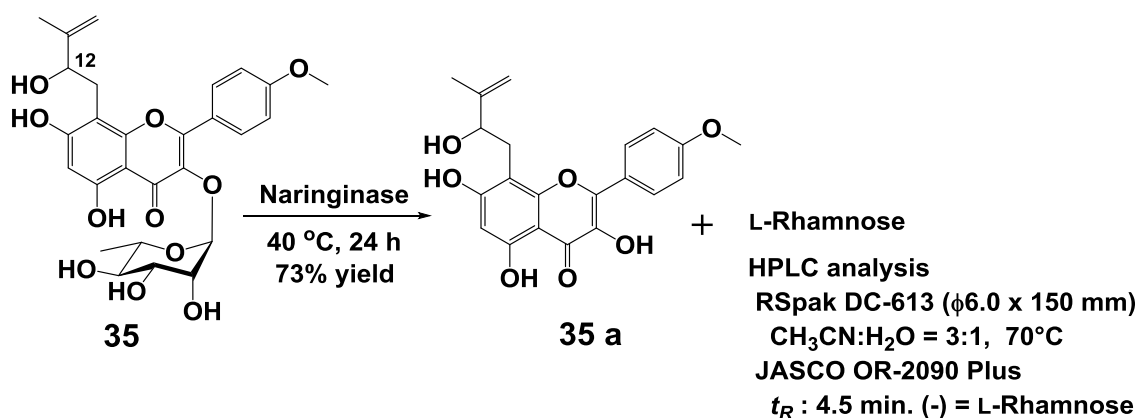


Fig. 23. Enzymatic hydrolysis of 35 and analysis of sugar moiety.

次に、化合物 **35 a** のフェノール性水酸基をジアゾメタンでメチル化し、シリカゲル、HPLC を用いて精製した結果、メチル体 **35 b** を 87% の収率で得た (Fig. 24)。最後に、化合物 **35 b** に (*R*)-(-)-MTPA-Cl [(*R*)-(-)- α -Methoxy- α -(trifluoromethyl) phenylacetyl Chloride] および (*S*)-(+)-MTPA-Cl 試薬をそれぞれ反応させ、対応する二つの MTPA エステル **35 b-S**、**35 b-R** をそれぞれ 53%、38% の収率で得た。

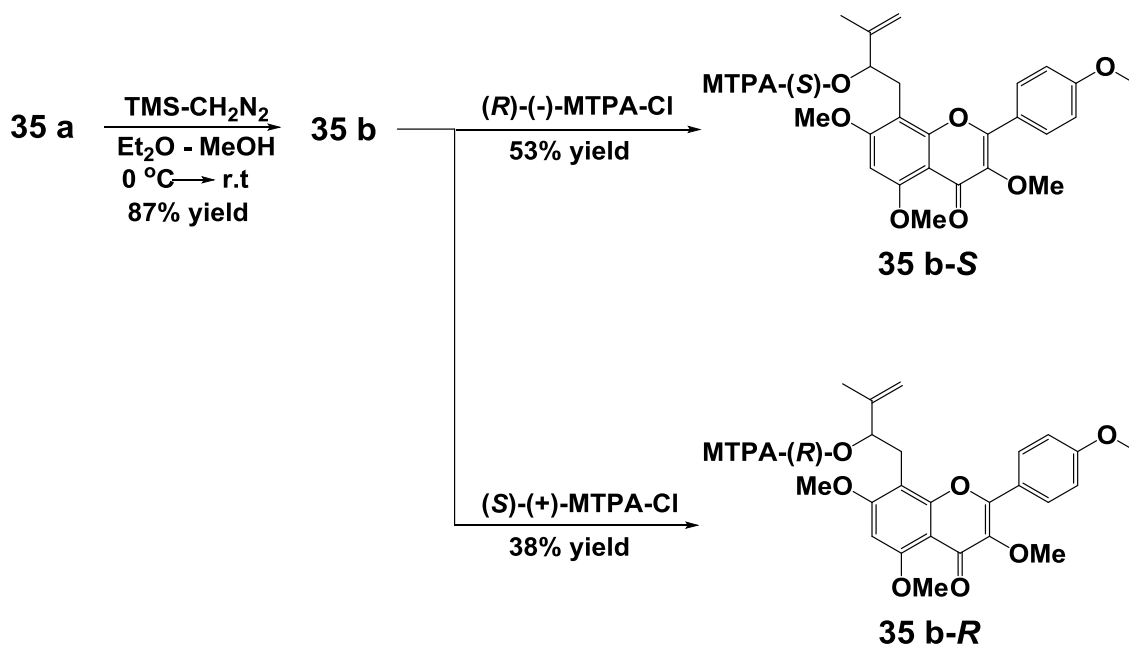


Fig. 24. Synthesis of (*R*)- and (*S*)-MTPA ester from 35 a.

得られた両化合物の $^1\text{H-NMR}$ を測定し、改良モッシャー法を適応したところ、Fig. 25 に示すようなケミカルシフトの分布が観測されたことから、化合物 **35** の 12 位の絶対立体構造は *S* 体であると決定した。本化合物は新規化合物であったため、**koreanoside E1** と命名した。

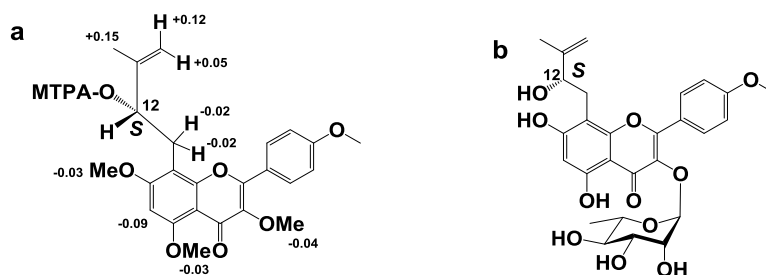


Fig. 25. Modified Mosher's method results of 35b (a), and the chemical structure of koreanoside E1 (35) (b). Difference of the $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of **35 b-S** and **35 b-R**. [$\Delta\delta$ (in ppm) = $\delta_S - \delta_R$].

(12) Koreanoside E2 (36)

化合物 **36** は、 $[\alpha]_D -48.5^\circ$ ($c=0.36$) の淡黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果、 m/z 529.1726 $[\text{M-H}]^-$ (Calcd for 529.1726) で組成式は $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$ と推定された。これは koreanoside E1 (**35**) と一致する。また、 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ のデータを見てみると (Table 6)、化合物 **36** と koreanoside E1 (**35**) はほぼ一致した。しかしながら、 $^{13}\text{C-NMR}$ において、C-3、C-4、C-15 位の炭素シグナルが koreanoside E1 (**35**) と比較すると、それぞれ 3.7, 0.6, 1.8 ppm 低磁場シフトして観測された。ナリンギナーゼ酵素加水分解の結果 (Fig. 27)、3 位に結合しているラムノースは、L-ラムノースと決定され、koreanoside E1 (**35**) と同じであることから、化合物 **36** は koreanoside E1 (**35**) の 12 位水酸基の立体の異なるジアステレオマーと推察された (Fig. 26)。そこで、酵素加水分解で得られたアグリコン **36a** を用いて、改良モッシャー法により 12 位の絶対立体構造の決定を行った (Fig. 27)。

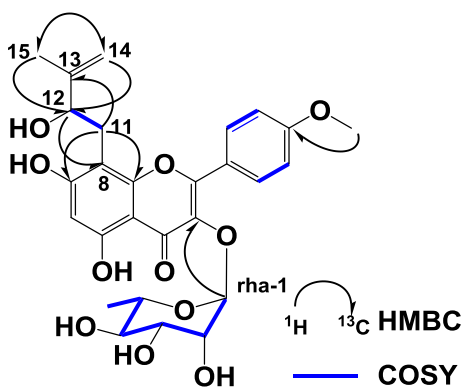


Fig. 26. Key HMBC & $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY correlations of 36.

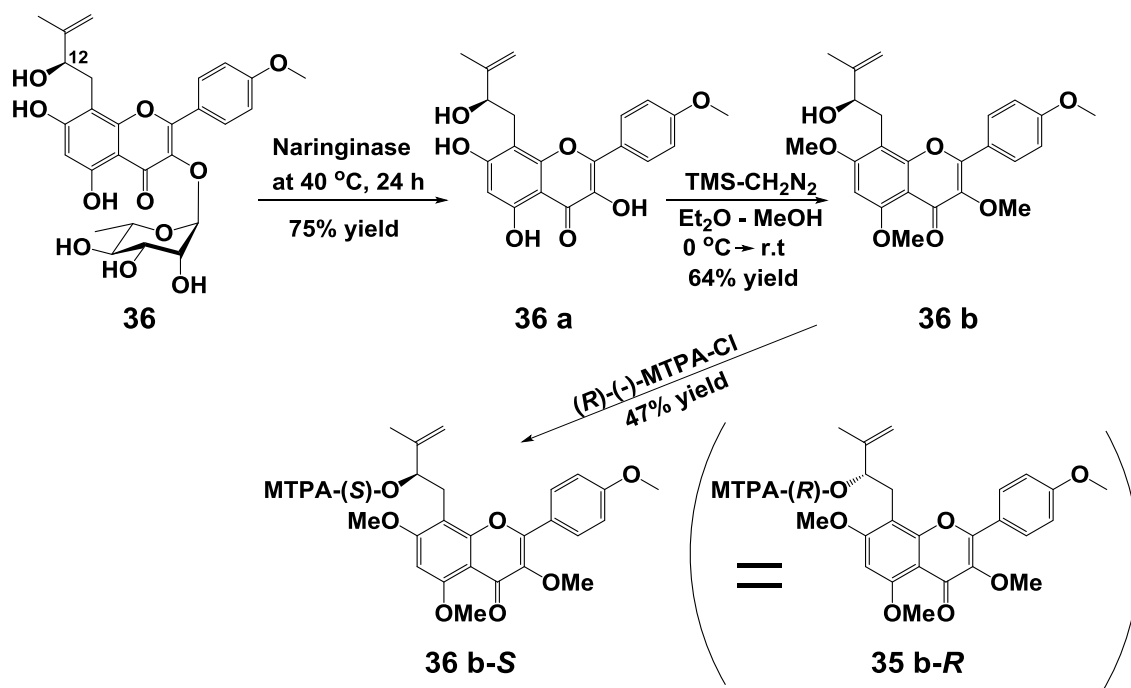


Fig. 27. Synthesis of (*S*)-MTPA ester (36 b-*S*) from 36.

化合物 35a の反応と同様に、化合物 36a をMTPAエステル 36b-*S* に変換した。本化合物は前述したkoreanoside E1 (35) の誘導体、35 b-*R* と鏡像異性体の関係にあることから、¹H-NMR のデータが完全に一致した。同様に、既に ¹H-NMR データを測定している化合物 35 b-*S* は、化合物 36 b に (*S*)-(+)-MTPA-Cl 試薬を用いて調製する 36 b-*R* と同一の ¹H-NMRスペクトルを示す。よって、化合物 36 b-*S* と 35 b-*S* (= 36 b-*R*) の ¹H-NMR の差をもとに、改良モッシャー法を適用し、化合物 36 の 12 位の炭素の立体化学は *R* と決定した (Fig. 28)。化合物 35 a, 36 a は鏡像異性体の関係にある。化合物 35, 36 は共通して 3 位に L-ラムノースが結合したことで、ジアステレオマーの関係となり、分離することが出来た。化合物 36 も新規化合物であることから、koreanoside E2 と命名した。

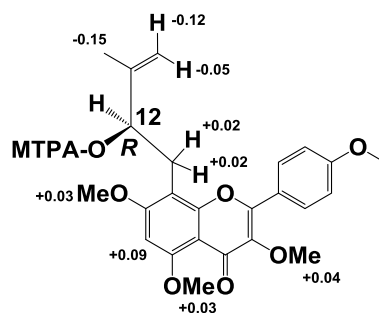


Fig. 28. Modified Mosher's method results of 36b. Difference of the ¹H-NMR chemical shifts between 36 b-*S* and 35 b-*S* (the enantiomer of 36 b-*R*) [$\Delta\delta$ (in ppm) = $\delta_S - \delta_R$].

Table 6. ¹H- and ¹³C-NMR data for koreanoside E1 (35) and E2 (36) in pyridine-*d*₅.

position	Koreanoside E1 (35)		Koreanoside E2 (36)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
2	156.5		156.8	
3	130.5		133.7	
4	178.8		179.4	
5	160.3		160.3	
6	99.5	6.81, 1H, s	99.1	6.84, 1H, s
7	164.0		164.0	
8	105.1		105.1	
9	155.2		155.3	
10	105.2		105.2	
11	30.3	3.43, 2H, m	30.3	3.44, 2H, m
12	75.1	4.92, 1H, dd, (5.7, 12.3)	74.9	4.92, 1H, t, (4.3)
13	104.8		105.0	
14	109.9	5.24, 4.89, each 1H, s	109.9	5.21, 4.87, each 1H, s
15	18.1	2.00, 3H, s	19.9	2.00, 3H, s
1'	122.3		122.3	
2'	130.8	8.20, 1H, d, (8.6)	131.6	8.28, 1H, d, (8.6)
3'	114.2	7.07, 1H, d, (8.6)	114.2	7.11, 1H, d, (8.6)
4'	161.8		161.8	
5'	114.2	7.07, 1H, d, (8.6)	114.2	7.11, 1H, d, (8.6)
6'	130.8	8.20, 1H, d, (8.6)	131.6	8.28, 1H, d, (8.6)
4'-OMe	55.1	3.67, 3H, s	55.1	3.67, 3H, s
13-OMe				
rha				
1	103.6	6.16, 1H, br s	103.1	6.25, 1H, br s
2	71.5	5.04, 1H, d, (2.9)	71.4	5.06, 1H, d, (1.8)
3	71.7	4.56, 1H, dd, (3.5, 9.8)	71.6	4.55, 1H, dd, (3.2, 9.2)
4	72.0	4.26, 1H, t, (9.8)	72.0	4.23, 1H, t, (9.2)
5	72.7	4.16, 1H, m	72.6	3.95, 1H, m
6	18.0	1.39, 3H, d, (6.3)	17.8	1.30, 3H, d, (6.3)

2-4-2-5 Epimedonin G (43), G1 (43-1), G2 (43-2) の構造決定

(13) Epimedonin G (43)

化合物 **43** は、 $[\alpha]_D +0.6^\circ$ ($c=0.54$) の黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果から m/z 461.1585 $[M+Na]^+$ (Calcd for 461.1576) で組成式は $C_{25}H_{26}O_7$ と推定された。 1H -NMR において (Table 7)、フラボノイド骨格の B 環由来の δ 7.83, 7.73 (each 1H, d, $J=1.7$ Hz) C 環と A 環に由来する δ 6.90, 6.85 (each 1H, s) のシグナルが観測された。また、3-methyl-but-3-en-2-ol 部分のシグナルが δ 3.39 (2H, d, $J=6.8$ Hz), 4.92 (1H, br s), 5.29, 4.93 (each 1H, s), 2.00 (3H, s) に、また、 γ,γ -dimethylallyl 基 (プレニル基) のシグナルが δ 5.58 (1H, br s), 3.72 (2H, br d, $J=6.3$ Hz), 1.63 (3H, s), 1.88 (3H, s) に観測された。 ^{13}C -NMR において (Table 7)、フラボン骨格 B 環は 1', 3', 4', 5' の 4 置換であること、 γ,γ -dimethylallyl 基、3-methyl-but-3-en-2-ol の部分構造が確認された。そこで、プレニル基部分とフラボン骨格の結合位置を決定するために、各種 2D-NMR を測定した。その結果、 δ 3.72 のメチレンプロトンから、それぞれ C-7, 8, 9 の炭素シグナル δ 162.5, 107.0, 158.3 に HMBC の相関がみられることから、 γ,γ -dimethylallyl 基は 8 位に結合していると判明した。また、 δ 3.39 のプロトンから、それぞれ C-4', 5', 6' の炭素シグナル δ 162.5, 107.0, 158.3 に HMBC の相関がみられることから、3-methyl-but-3-en-2-ol 部分は B 環の 5' 位に結合していることが判明した。以上のデータより、化合物 **43** の平面構造式は Fig. 29 に示すように決定した。本化合物は新規化合物であるため、**epimedonin G** と命名した。

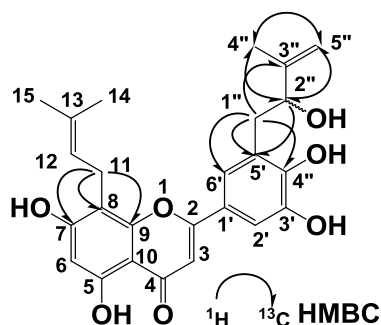


Fig. 29. Key HMBC correlations of **43**.

さて、本化合物は 2'' 位に二級水酸基を持つ不斉炭素原子を有する。しかしながら、比旋光度の値が $[\alpha]_D +0.6^\circ$ と、ほとんど 0 に等しいため、2'' 位炭素に関する鏡像異性 (*R* 体、*S* 体) の 1 : 1 の当量混合物、すなわちラセミ体である。そこで著者は、キラルカラムを用いた光学分割を行った。各種キラルカラムを用いた光学分割分析の結果、多糖誘導体の Daicel Chiralpak IA カラムを用いて良好に分離した。本カラムで繰り返し分取を行うことで、鏡像異性体として化合物 **43-1**, **43-2** を面積比 1 : 1 の通りの収量で単離することが出来た (Chart 3)。

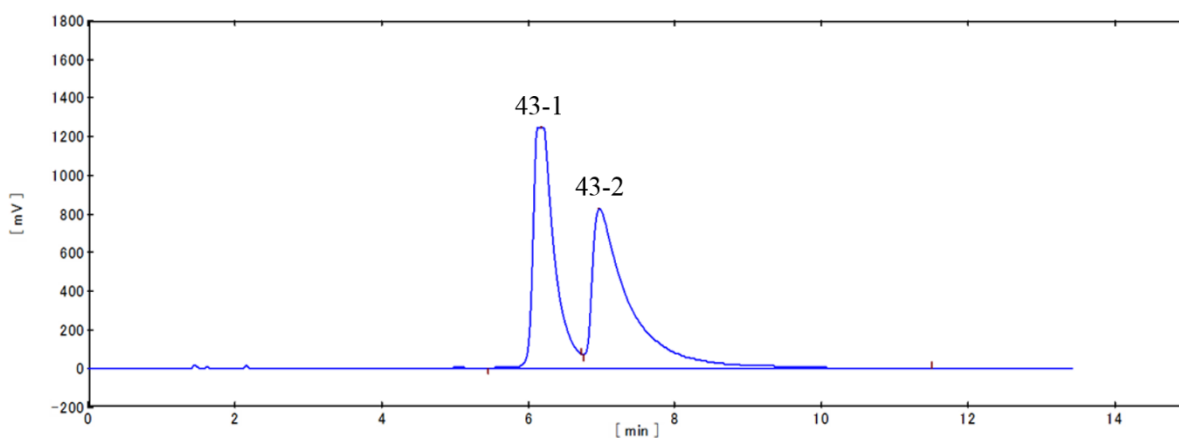
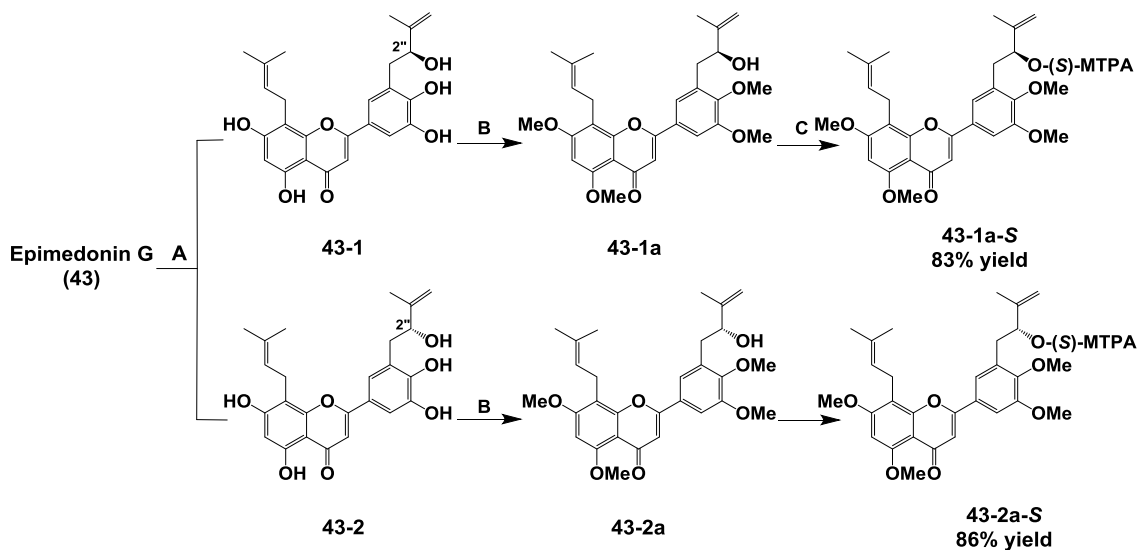


Chart 3.

化合物 **43-1**, **43-2** の $^1\text{H-NMR}$ を測定したところ、epimedonin G (**43**) と同様のチャートが得られたこと、またそれぞれの比旋光度が $+14.2$, -12.8 であったため、この2つの化合物は鏡像異性体の関係にあることが確認された。そこで、化合物 **43-1**, **43-2** の絶対立体構造を決定するために、改良モッシャー法による解析を試みた。

化合物 **43-1**, **2** は、先ず、フェノール性水酸基をジアゾメタンでメチル化し、シリカゲル、HPLCを用いて精製し、それぞれ73%の収率で化合物 **43-1a**, **43-2a** を得た。次に、 (R) -(-)-MTPA-Cl 試薬を用いて MTPA エステルを合成した。反応液を減圧乾固後、シリカゲル、HPLC で精製を行った結果、それぞれ 83%, 86% の収率で化合物 **43-1a-S**, **43-2a-S** を得た (Fig. 30)。



A: Optical resolution by Chiral HPLC on Daicel Chiralpak IA (Hexane : EtOH = 9 : 1)

B: $\text{TMS-CH}_2\text{N}_2$ in Hexane, MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$ to r.t., each 73% yield.

C: (R) -(-)-MTPA-Cl, WSC, DMAP, CH_2Cl_2 , r.t.

Fig. 30. Synthetic route of compounds **43-1a-S** and **43-2a-S**.

化合物**43-1** と化合物**43-2** は互いに光学異性体であることから、化合物 **43-2a-S** の 2''位とMTPA 試薬の両方の立体を同時に反転させると、化合物**43-1a** に (*S*)-(+)-MTPA-Cl を付加させた化合物**43-1a-R** の¹H-NMR と同じスペクトルになる。従って、改良モッシャー法より、化合物 **43-1** の2''位は*S* 体と決定した (Fig. 31)。また、同様の方法により、化合物 **43-2** の2''位は*R* 体と決定した。光学分割して得られた化合物はそれぞれ、**epimedonin G1 (43-1)**, **epimedonin G2 (43-2)** と命名した。

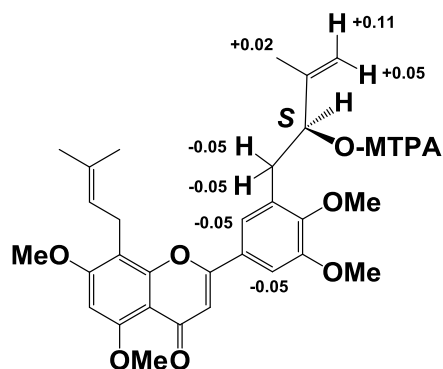


Fig. 31. Modified Mosher's method applied to compound 43-1a. Difference of ¹H-NMR chemical shifts of compound **43-1a-S** and **43-2a-S (=43-1a-R)**. [$\Delta\delta$ (in ppm) = $\delta_S - \delta_R$].

2-4-2-6 Epimedonin H (44), H1 (44-1), H2 (44-2) の構造決定

(14) Epimedonin H (44)

化合物 **44** は、 $[\alpha]_D +0.9^\circ$ ($c=0.38$) の黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果から m/z 437.1631 $[M-H]^-$ (Calcd for 437.1600) で組成式は $C_{25}H_{26}O_7$ と推定され、epimedonin G (**43**) と同一であった。 1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータより (Table 7)、本化合物は epimedonin G (**43**) に結合している 2 本のプレニル基の結合位置が異なる類似化合物であると推定された。そこで、2 つのプレニル基のフラボン骨格への結合位置を決定するために、各種 2D-NMR を測定した。その結果、 γ,γ -dimethylallyl 基由来のメチレンプロトン δ 3.73 (2H, d, $J=7.5$ Hz) から、それぞれ C-4', 5', 6' の炭素シグナル δ 149.9, 147.0, 111.9 に HMBC の相関がみられたこと、また 3-methyl-but-3-en-2-ol 部分に由来するメチレンプロトン δ 3.73 (2H, d, $J=7.5$ Hz) からそれぞれ C-7, 8, 9 位の炭素シグナル δ 163.4, 105.0, 155.9 に HMBC の相関が認められたことより、化合物 **44** の平面構造式は Fig. 32 のように決定した。本化合物は新規化合物であるため、**epimedonin H** と命名した。

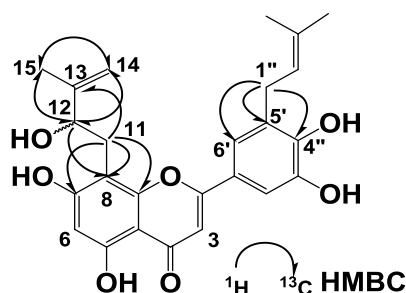


Fig. 32. Key HMBC correlations of **44**.

なお、本化合物は 12 位に二級水酸基を持つ不斉炭素原子を有するが、比旋光度の値が $[\alpha]_D +0.9^\circ$ と、ほとんど 0 に等しいため、ラセミ化合物である。そのため、epimedonin G (**43**) と同様にキラルカラムによる光学分割を行った。その結果、Epimedonin H (**44**) は Daicel Chiralpak IA をカラムに用いたキラル HPLC による光学分割を行ったところ良好に分離し、鏡像異性体として化合物 **44-1**, **44-2** を 1:1 の収量で単離することが出来た (Chart 4)。また、化合物 **44-1**, **44-2** の比旋光度はそれぞれ +15.5, -13.0 であることから、この 2 つの化合物は鏡像異性体の関係にあることが確認された。

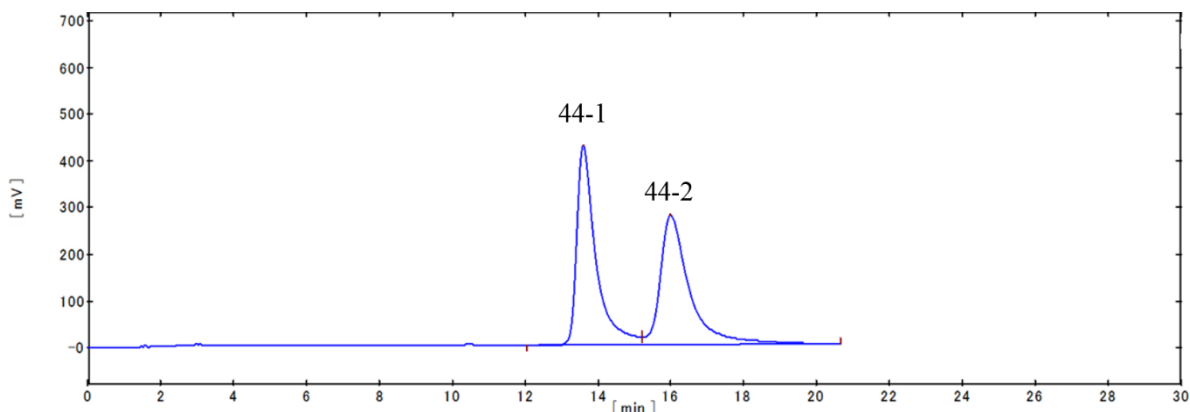


Chart 4.

得られた化合物 **44-1, 2** は化合物 **43-1, 2** と同様、フェノール性水酸基をジアゾメタンでメチル化し、*(R)*-(-)-MTPA-Cl 試薬を用いてMTPAエステルを合成し、化合物 **44-1a-S, 44-2a-S** を得た (Fig. 33)。

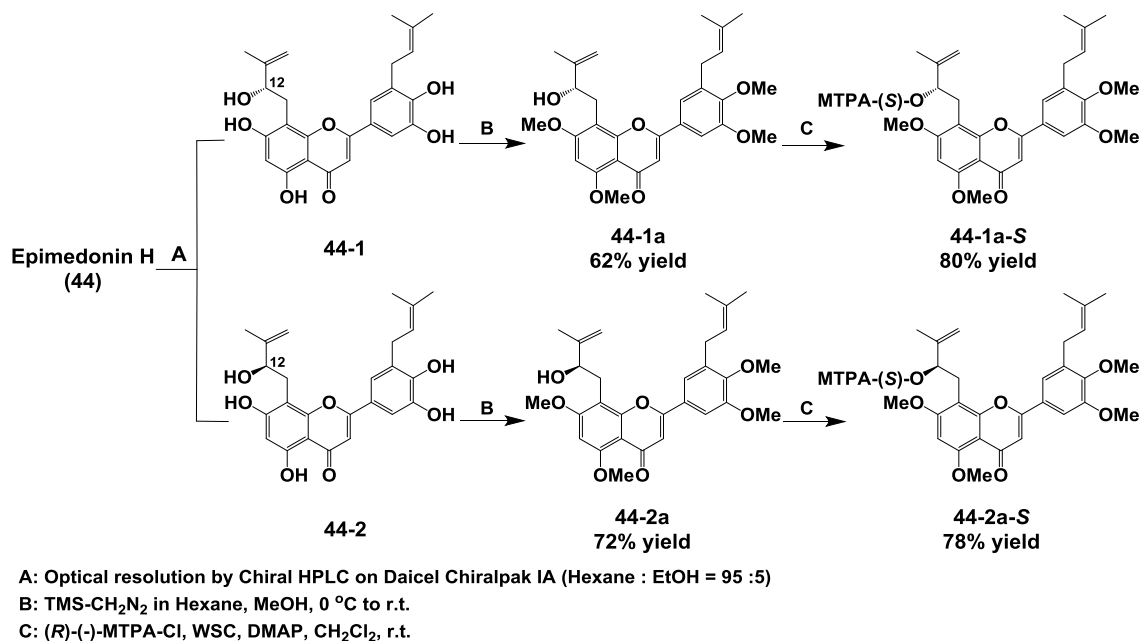


Fig. 33. Synthetic route of compounds **44-1a-S** and **44-2a-S**.

得られた化合物 **44-1a-S** と化合物 **44-2a-S** の両者の間で改良モッシャー法を適用し、化合物 **44-1, 44-2** の 12 位炭素の絶対立体構造はそれぞれ *S* 体、*R* 体と決定した (Fig. 34)。光学分割して得られた化合物を、それぞれ **epimedonin H1 (44-1)**, **epimedonin H2 (44-2)** と命名した。

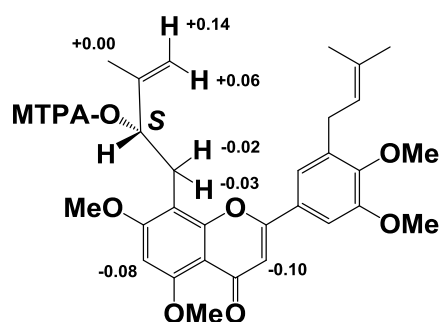


Fig. 34. Modified Mosher's method applied to compound 44-1a. Difference of $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of compounds **44-1a-S** and **44-2a-S (=44-1a-R)**. [$\Delta\delta$ (in ppm) = $\delta_S - \delta_R$].

Table.7. $^1\text{H-}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data for epimedonin G (43) and H (44) in pyridine- d_5 .

position	Epimedonin G (43)		Epimedonin H (44)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
2	164.8		164.8	
3	103.3	6.94, 1H, s	103.1	6.86, 1H, s
4	182.7		182.8	
5	160.2		160.2	
6	98.8	6.90, 1H, s	98.8	6.82, 1H, s
7	162.5		163.4	
8	107.0		105.0	
9	155.9		155.9	
10	104.5		104.5	
11	22.0	3.72, 2H, br d (6.3)	30.1	3.49, 2H, br d (6.3)
12	123.0	5.58, 1H, br s	74.9	4.96, 1H, t, (6.9)
13	131.3		129.7	
14	17.9	1.63, 3H, s	110.3	5.14, 4.83, each 1H, s
15	25.4	1.88, 3H, s	17.6	2.04, 3H, s
1'	122.1		122.1	
2'	112.1	7.83, 1H, d (1.7)	111.6	7.91, 1H, d, (2.3)
3'	146.2		146.4	
4'	148.4		148.4	
5'	129.6		129.6	
6'	121.5	7.73, 1H, d (1.7)	119.8	7.70, 1H, d (2.3)
1''	38.0	3.38, 2H, d (6.8)	22.0	3.73, 2H, d, (7.5)
2''	75.3	4.93, 1H, br s	123.0	5.66, 1H, t, (7.5)
3''	127.7		132.1	
4''	110.4	5.25, 4.92, each 1H, s	17.7	1.70, 3H, s
5''	17.8	2.00, 3H, s	25.4	1.78, 3H, s

2-4-2-7 Epimedonin E (45), F (46) の構造決定

(15) Epimedonin E (45)

化合物 **45** は黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果から m/z 417.1303 $[M+Na]^+$ (Calcd for 417.1338) で組成式は $C_{25}H_{21}O_6$ と推定された。 1H -NMR において、2つのメタカップリングしたアロマティックプロトンのシグナル δ 7.99, 7.76 (each 1H, d, $J=2.3$ Hz)、独立した二つのアロマティックプロトンのシグナル δ 7.09, 7.13 (each 1H, s) より、化合物 **45** は epimedonin G (**43**), H (**44**) と類似の luteolin 型のフラボノイド骨格で、A 環と B 環にそれぞれプレニル基が結合していることが推察された。プレニル基のシグナルとして、 γ,γ -dimethylallyl 基のシグナル δ 5.70 (1H, t, $J=7.4$ Hz), 3.81 (2H, d, $J=7.4$ Hz), 1.79 (1H, s), 1.96 (3H, s) が観測された。また、koreanoside H (**38**) にみられた 2-(prop-1-en-2-yl) furan 構造由来のシグナルが δ 5.86, 5.26 (each 1H, s), 2.09 (3H, s) に観測された。一方、 ^{13}C -NMR シグナルにおいて (Table 8)、C-9 の炭素が δ 149.0 と大きく高磁場に観測されたことから、フラン環は A 環に結合していることが推察された。プレニル基部分構造の結合位置を決定するために、各種 2D-NMR を測定した。その結果、 γ,γ -dimethylallyl 基由来のメチレン基のプロトン (δ 3.81) からそれぞれ C-4', 5', 6' の炭素に HMBC の相関がみられたことから、 γ,γ -dimethylallyl 基の結合位置は B 環 5' 位と決定した。また、 δ 6.95 のオレフィニックプロトンからフラボノイド骨格の C-7, 8, 9 に対応する δ 159.2, 110.6, 149.0 の炭素に相関がみられたことから、2-(prop-1-en-2-yl) furan 部分は、A 環 7 位、8 位に結合していることが明らかとなった。以上のデータを総合すると、化合物 **45** は Fig. 35 に示すような構造と決定され、新規化合物であることから、**epimedonin E** と命名した。

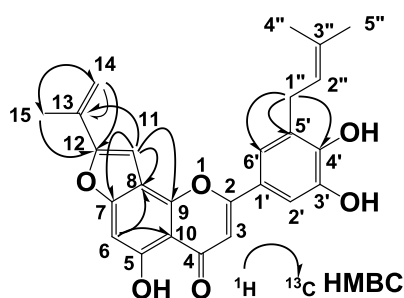


Fig. 35. Key HMBC correlations of **45**.

(16) Epimedonin F (46)

化合物 46 は黄色粉末として得られ、また HR-ESI-MS の結果から m/z 419.1511 [M-H]⁻ (Calcd for 419.1495) で組成式は C₂₅H₂₃O₆ と epimedonin E (45) と同一であった。¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータ (Table 8) を epimedonin E (45) と比較すると、A 環に結合しているプレニル基のシグナル以外はよく一致した。¹H-NMR において δ 6.78 (1H, d, J = 10.3 Hz), 5.61 (1H, d, J = 10.3 Hz) に *cis* 配置の二置換オレフィンプロトン、 δ 1.49 (6H, s) に末端メチル基のシグナルが 2 本観測されたことから、プレニル基は A 環と 2-2 dimethylpyran 環を形成していると推察された。そこで、プレニル基の構造と結合位置を決定するために、各種 2D-NMR を測定した。その結果、 δ 6.78 のオレフィニックプロトンからフラボノイド骨格の C-7, 8, 9 位に対応する δ 164.6, 103.2, 152.0 の炭素に、また、 δ 5.61 のオレフィニックプロトンから C-8 に対応する δ 103.2 の炭素に HMBC の相関が観測された。以上のデータより、2-2 dimethylpyran 環部分は A 環の C-7, 8 位間で形成していると決定した。よって、化合物 46 を Fig. 36 に示す構造と決定した。新規化合物であることから epimedonin F と命名した。

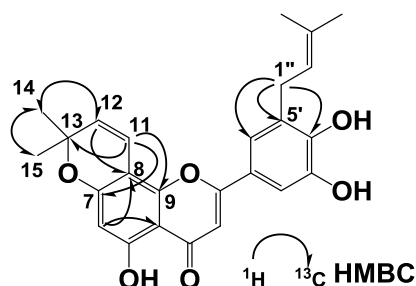


Fig. 36. Key HMBC correlations of 46.

2-4-2-8 Epimedokoreanin C1 (EK-C-1), C2 (EK-C-2) の構造決定

Epimedokoreanin C (EK-C (11)) はC-1'' とC-2'' の 2 ヶ所に不斉炭素原子が存在する既知プレニルフラボノイドである。しかし、その立体に関しては未検討であったため、著者はC-1'' およびC-2'' の立体について検討した。EK-C (11) がラセミ体であることから、C-1'' とC-2'' の組み合わせは (S,S)、(R,R) または (S,R) (R,S) の 2 通りである。そこで、先ずC-1'' とC-2'' の相対配置について検討した。EK-C (11) の¹H-NMR において、H-1'' とH-2'' の J 値は 4.5 Hz と判明した。そこで、カプラス則による二面角の検討を行った (Fig. 37) ところ、ビシナル水素の二面角は 120°、即ち、C-1'', 2'' 位間の相対配置はアンチ型と推定された。

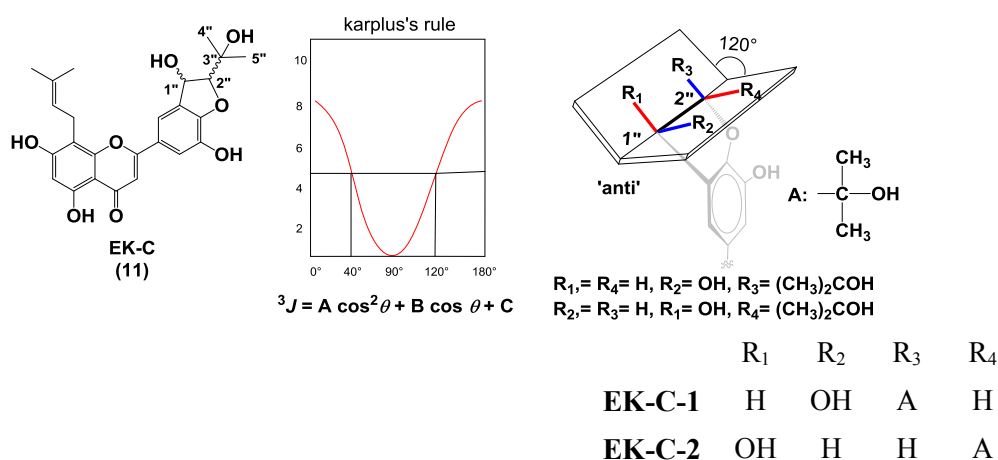


Fig.37. Relative structures of EK-C (11) proposed by Karplus's rule.

また、NOESY 測定より、H-1'', 2''からそれぞれ、H-4'', 5'' 位のメチル基プロトンへの NOE 相関は観察されたが、H-1'', 2''間で NOE の相関は観測されなかった (Fig. 38)。この結果は、H-1'', 2'' のプロトンはアンチ配置であることを支持している。

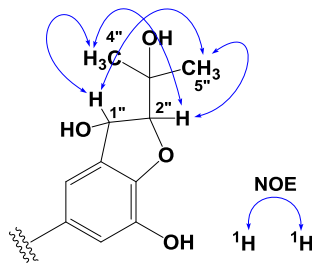


Fig. 38. Key NOESY correlations of EK-C (11).

また、キラルカラムによる光学分割を行ったところ、EK-C (11) は、Daicel Chiralpak IA をカラムに用いたキラルHPLCにより、鏡像異性体として EK-C-1, EK-C-2 を

1 : 1 の収量で光学分割して単離することが出来た (Chart 5)。なお、**EK-C-1**, **EK-C-2** の比旋光度はそれぞれ -29.1 , $+21.3$ であることからこの2つの化合物は鏡像異性体であることが確認された。

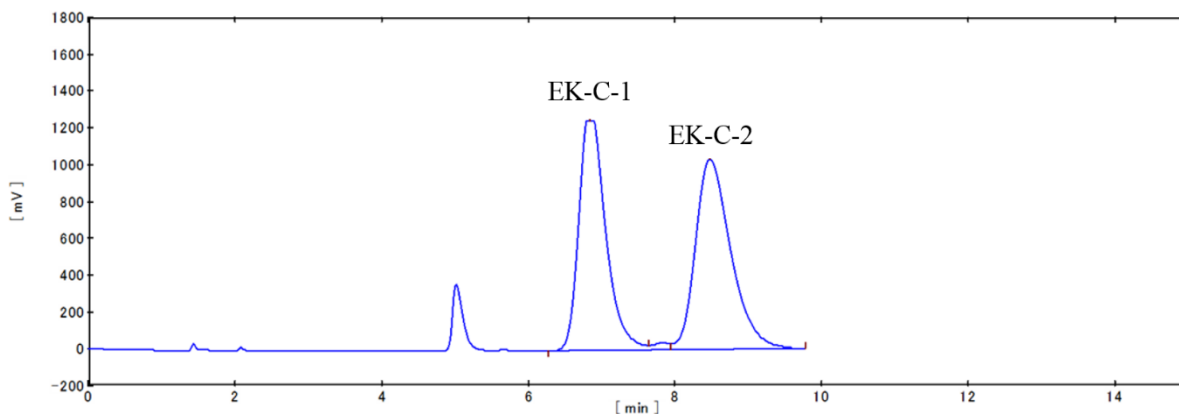
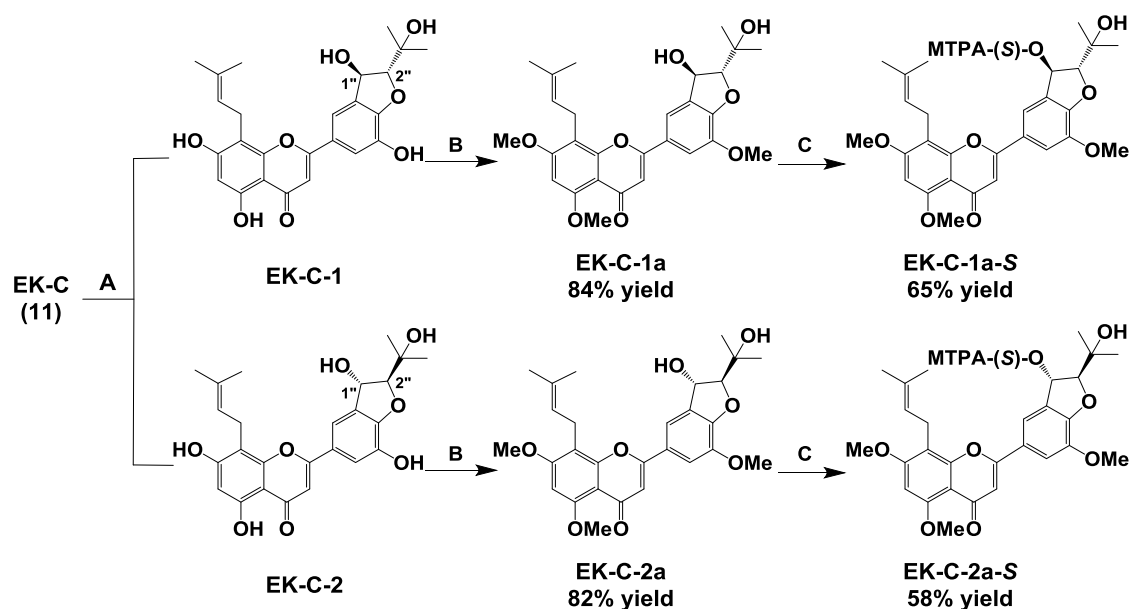


Chart 5.

化合物 **43-1, 2** と同様の方法で、化合物 **EK-C-1**, **EK-C-2** のMTPA エステルを合成した (Fig. 39)。得られた化合物 **EK-C-1a-S**, **EK-C-2a-S** は改良モッシャー法を適用し、化合物 **EK-C-1**, **EK-C-2** の1''位炭素の絶対立体構造はそれぞれ*R* 体, *S* 体と決定した (Fig. 40)。



A: Optical resolution by Chiral HPLC on Daicel Chiralpak IA (Hexane : EtOH = 9 : 1)

B: TMS-CH₂N₂ in Hexane, MeOH, 0 °C to r.t.

C: (*R*)-(-)-MTPA-Cl, WSC, DMAP, CH₂Cl₂, r.t.

Fig. 39. Synthetic route of **EK-C-1a-S** and **EK-C-2a-S**.

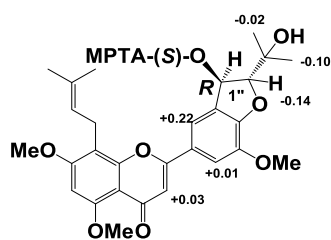


Fig. 40. Modified Mosher's method applied to compound EK-C-1a. Difference of $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of **EK-C-1a-S** and **EK-C-2a-S (=EK-C-1a-R)**. [$\Delta\delta$ (in ppm) = $\delta_S - \delta_R$].

EK-C-1, 2 のC-1'', 2'' 間の相対配置はアンチ型であることから、**EK-C-1, EK-C-2** の2'' 位炭素の絶対立体構造はそれぞれ*R* 体、*S* 体と決定できる。以上のデータより、**EK-C-1** と**EK-C-2** のC-1'', 2'' の立体化学は、それぞれ (*R, R*) と (*S, S*) と決定した。**EK-C-1**、および**EK-C-2** はそれぞれ **epimedokoreanin C1 (EK-C-1)**, **epimedokoreanin C2 (EK-C-2)** と命名した。

Table 8. ¹H- and ¹³C-NMR data for epimedonin E (45) and F (46) in pyridine-*d*₅.

position	Epimedonin E (45)		Epimedonin F (46)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
2	165.2		159.5	
3	104.7	7.09, 1H, s	103.8	6.52, 1H, s
4	183.4		182.8	
5	159.4		161.2	
6	94.7	7.13, 1H, s	100.2	6.27, 1H, s
7	159.2		64.6	
8	110.6		103.2	
9	149.0		152.0	
10	107.6		101.5	
11	100.1	6.95, 1H, s	114.8	6.78, 2H, d (10.3)
12	156.6		127.5	5.61, 1H, d (10.3)
13	132.5		77.1	
14	113.7	5.86, 5.26, 1H, s	27.5	1.49, 3H, s
15	19.2	2.09, 1H, s	28.2	1.49, 3H, s
1'	121.6		122.0	
2'	111.9	7.99, 1H, d (2.3)	110.2	7.33, 1H, d (1.8)
3'	147.0		146.7	
4'	149.9		147.0	
5'	130.2		128.3	
6'	120.2	7.76, 1H, d (2.3)	119.5	7.29, 1H, d (1.7)
1''	29.2	3.81, 2H, d (7.4)	28.0	3.41, 2H, m
2''	123.5	5.70, 1H, t (7.4)	121.5	5.38, 1H, t, (7.5)
3''	132.6		134.0	
4''	17.9	1.79, 3H, s	17.8	1.77, 3H, s
5''	25.9	1.96, 3H, s	25.8	1.82, 3H, s

イカリソウの CML, CMA 生成阻害活性画分より得られた新規プレニルフラボノイドの化学構造式をまとめて Fig. 41 に示す。

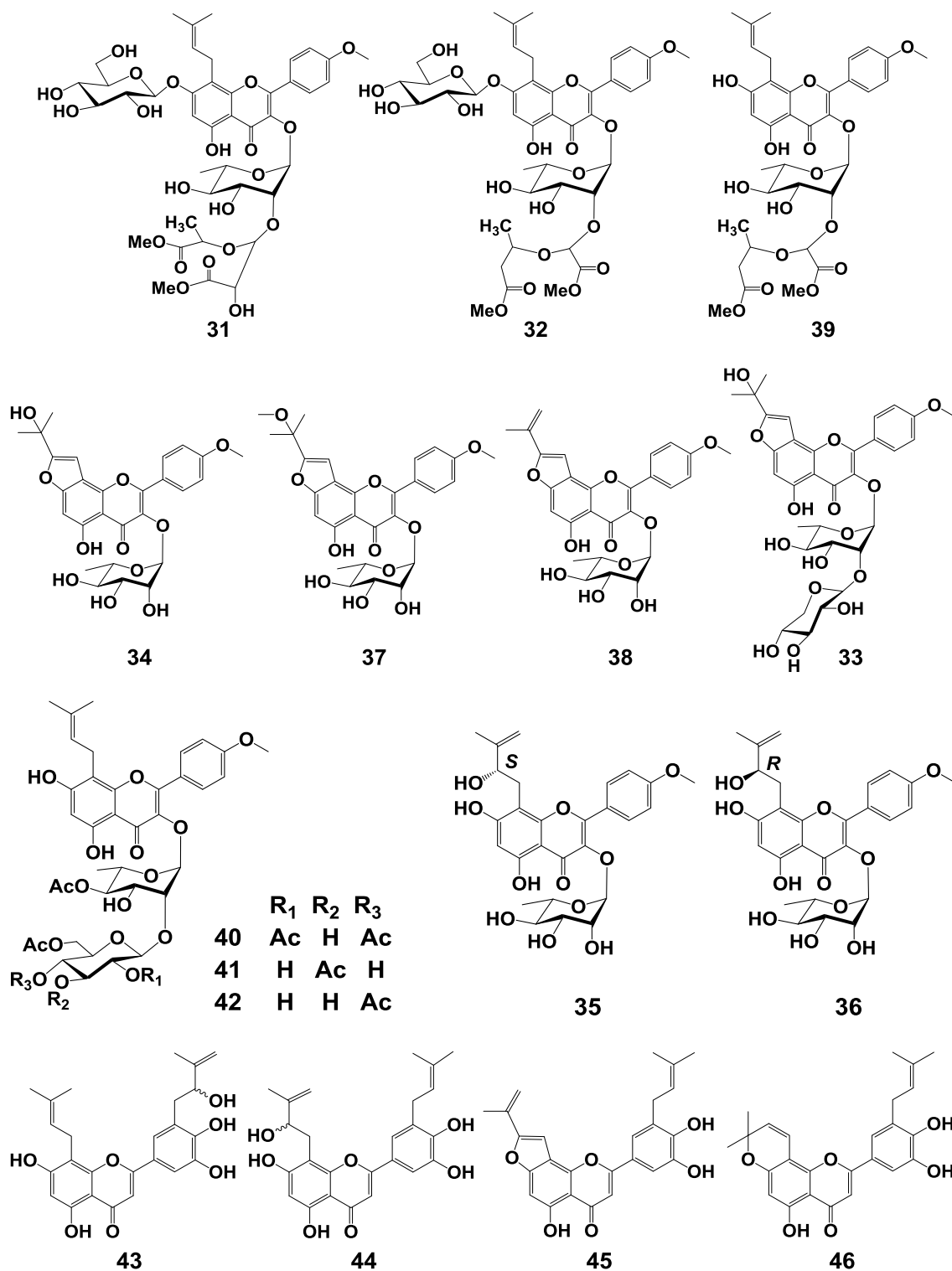


Fig. 41. New prenylflavonoids isolated from *Epimedium Herba*.

ラセミ体を光学分割して絶対配置を決定した光学活性体の構造式をまとめてFig. 42 に示す。

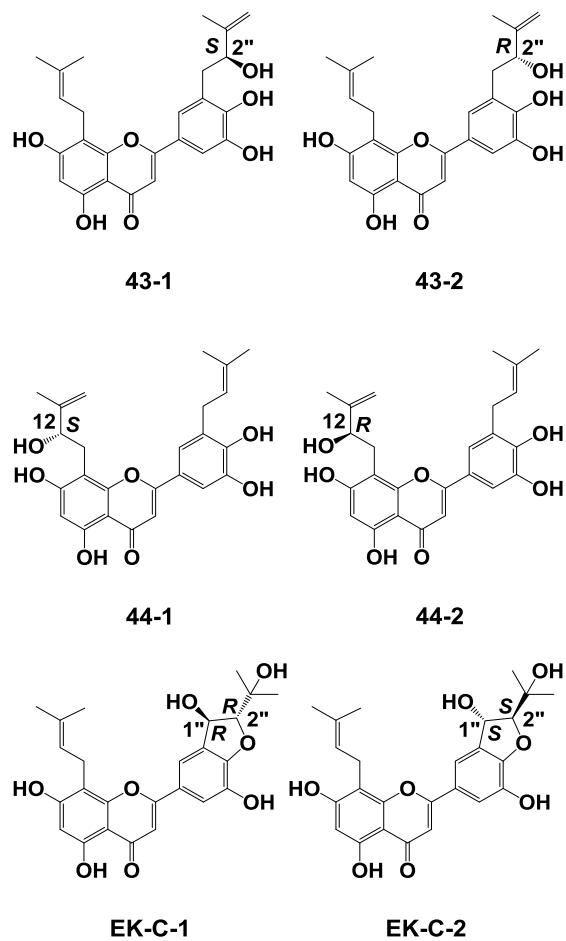


Fig. 42. Optical active compounds isolated by chiral HPLC on Daicel Chiralpak IA.

2-5 小括

ウチダ和漢薬より購入したイカリソウをメタノール抽出し、CML, CMA 生成阻害活性を指標に各種カラムクロマトグラフィーを駆使して分離精製し、50個のプレニルフラボノイドを単離した。得られた化合物は、各種スペクトルデータ (NMR、ESI-MS、 $[\alpha]_D$ など) を中心に化学構造の決定を行った。その結果、既知プレニルフラボノイド30個を同定するとともに、新規プレニルフラボノイド20個の化学構造を明らかにすることができた。さらに、不斉炭素を有する化合物に関しては、酵素加水分解や光学分割の後、MTPAエステルに誘導し、改良モッシャー法を用いて絶対立体構造の決定を行った。本章で構造決定を行った新規プレニルフラボノイド (31~46) について、化学的な特徴を以下に示す。

Icarinoside A (31), B (32), C (39) は、epimedin C (5) の末端ラムノースがC-3''とC-4'' (a)、または C-2''とC-3'' (b) の間で酸化的開裂した関連化合物と推定した (Fig. 43)。Icarinoside A (31) の場合、酸化的開裂 (a) で生成したカルボキシル基がメチル化されて生成した化合物である。一方、icarinolide B (32), C (39) の場合、酸化開裂 (b) に続き、C-4''の還元を経て、カルボキシル基がメチル化された化合物である (Fig. 43)。さらに、icarinolide C (39) は、icarinolide B (32) の7位グルコースが外れて生成した化合物である。

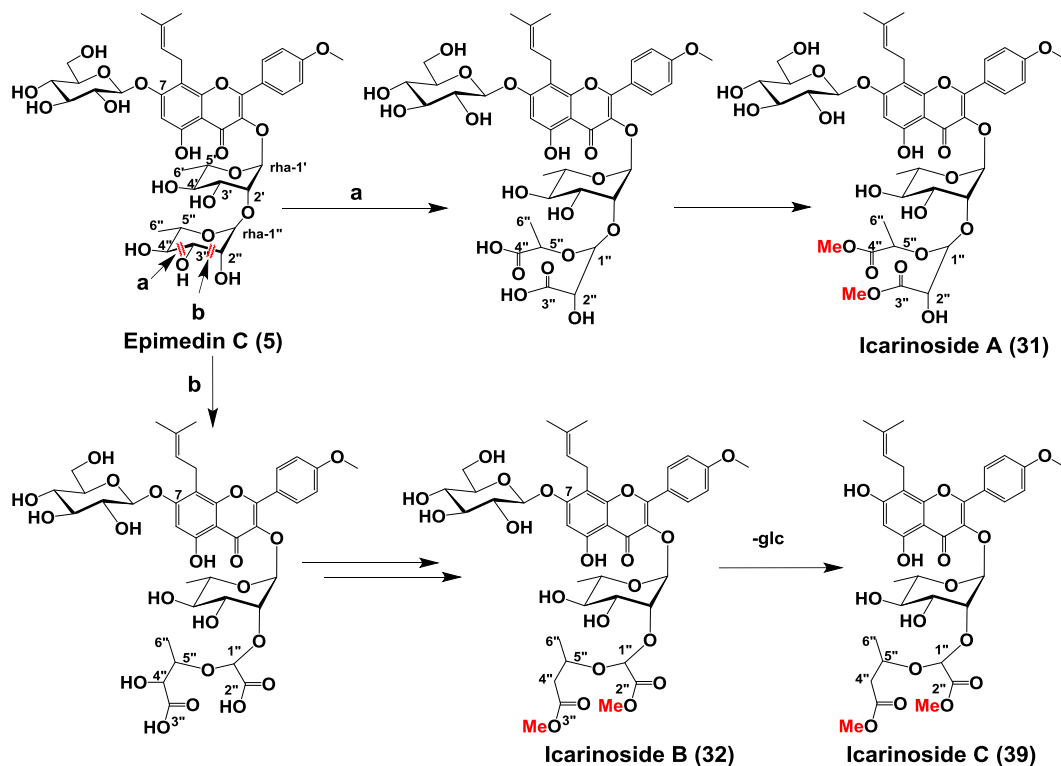


Fig. 43. Presumable biosynthesis pathway for icarinoside A (31), B (32), and C (39) from epimedin C (5).

一般に、配糖体の末端糖部が開裂している化合物は希少である。その一例として、テンサイ (*Beta vulgaris* L.) から単離されたトリテルペン配糖体の **betavulgarosides I~IV**の報告がある⁶⁵。この場合、末端アラビノースの3位と4位の間で酸化開裂した開環構造体 (III, IV) と、さらに dioxolane 環を形成した構造体 (I, II) がある。Icarinoside A~C のようにフラボノイド配糖体で末端ラムノースが酸化開裂した化合物は、これまでに例の無い新しい構造である。この場合、生合成の際に生成したカルボキシル基は、全てメチルエステル体として得られている。これは、抽出に用いた MeOH 由来と推察される。一方、酸化開裂してカルボン酸で存在した場合、分離が困難であったと予想される。

Koreanoside E1 (**35**), E2 (**36**) は icariside II (**17**) 由来の酸化誘導体で、互いに12位の水酸基に関する立体異性体と決定した。生合成経路を考察すると、icariside II のプレニル基部分がエポキシ化された **neoicariin** (立体化学不明)⁶⁶ が中間体となり、エポキシ環の開裂により、12,13位に水酸基が生じる (Fig. 44)。このとき、水の付加反応は立体選択性が無かったと推察される。次に、生成した2組の化合物はそれぞれ、C-13位の水酸基の脱離によるエキソメチレンの生成を経て、koreanoside E1 (**35**)、E2 (**36**) が生成したと推定している。

Koreanoside E1 (**35**), E2 (**36**) の12位の炭素の絶対立体配置は改良モッシャー法を適用し、それぞれ、*S*体と*R*体と決定した。一般に、ラセミ体の分離は ODS カラムを用いた HPLC では困難であるが、両化合物には共通して3位にL-ラムノースが結合していることから、ジアステレオマーの関係であるので、分離することが出来た。

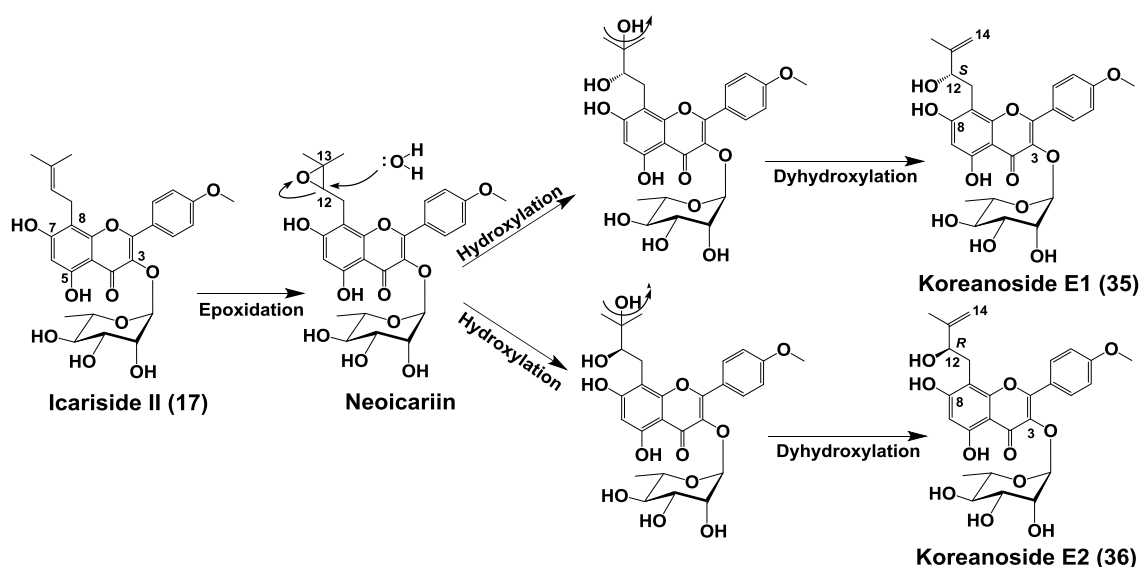


Fig. 44. Presumable biosynthesis pathway for koreanoside E1 (35**) and E2 (**36**) from icariside II (**17**).**

また、koreanoside F (34), G (37), H (38), I (33) も icariside II (17) 由来の酸化誘導体で、フラボン骨格 8 位のプレニル基が 7 位の水酸基と縮合して、フラン環を形成した化合物群と決定した。生合成経路を考察すると、icariside II より生成する neoicariin のエポキシ環の 12 位に A 環 7 位の水酸基が求核攻撃しエポキシ環が開裂し、C-11, 12 位の水素が塩基により脱水素化することでフラン環が形成され、koreanoside F (34) が生成したと推定した (Fig. 45)。引き続き、korepimedeside F (34) の 13 位水酸基のメチル化、ラムノースの 2 位へのキシロースの付加、13 位水酸基の脱水反応を経て、それぞれ korepimedeside G (37), I (33), H (38) が生成したものと推察している。

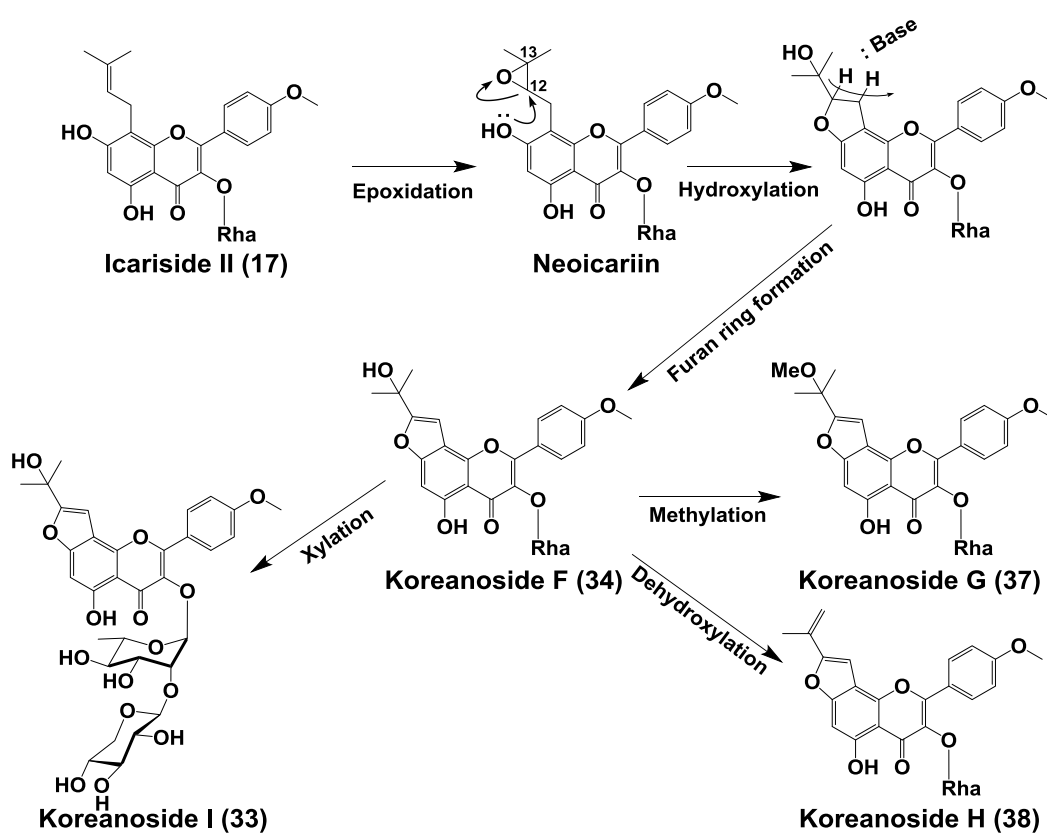


Fig. 45. Presumable biosynthesis pathway for koreanoside F (34), G (37), H (38), and I (33) from icariside II (17).

Korepimedeside D (40), E (41), F (42) は korepimedeside A (19) を基本ユニットとする 2 糖配糖体で、末端のグルコースの水酸基の 2 位、3 位、4 位がそれぞれアセチル化された構造と決定した。Epimedin A (3), B (4), C (5) や sagittatoside A (13)、2''-*O*-ramnosyl icarisid II (14) などのように糖の水酸基がアセチル化されていない場合、ラムノースの 2 位に末端の糖が結合する。一方、糖の水酸基がアセチル化された場合、今回構造決定した korepimedeside D (40), E (41), F (42) や、既知化合物

の epimedin I (6), K (7), L (8), caohuaside (10), epimedokoreanoside I (19) ら全てに共通して、ラムノースの 3 位に末端グルコースが結合することが特徴である (Fig. 46)。

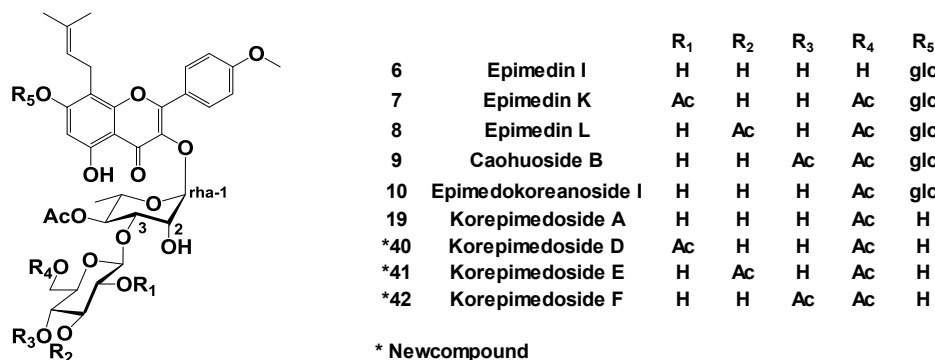


Fig. 46. Characteristic structures of acetyl prenylflavonoid glycosides from *E. Herba*.

アグリコンとして得られた epimedonin G (43), H (44) は、epimedokoreanin B (EK-B) (28) 由来の酸化誘導体で、koreanoside E1 (35), E2 (36) と同様にプレニル基の二重結合のエポキシ化を鍵反応として、エポキシ環の開裂と水酸基の脱離を経て生合成されると推察している (Fig. 47)。

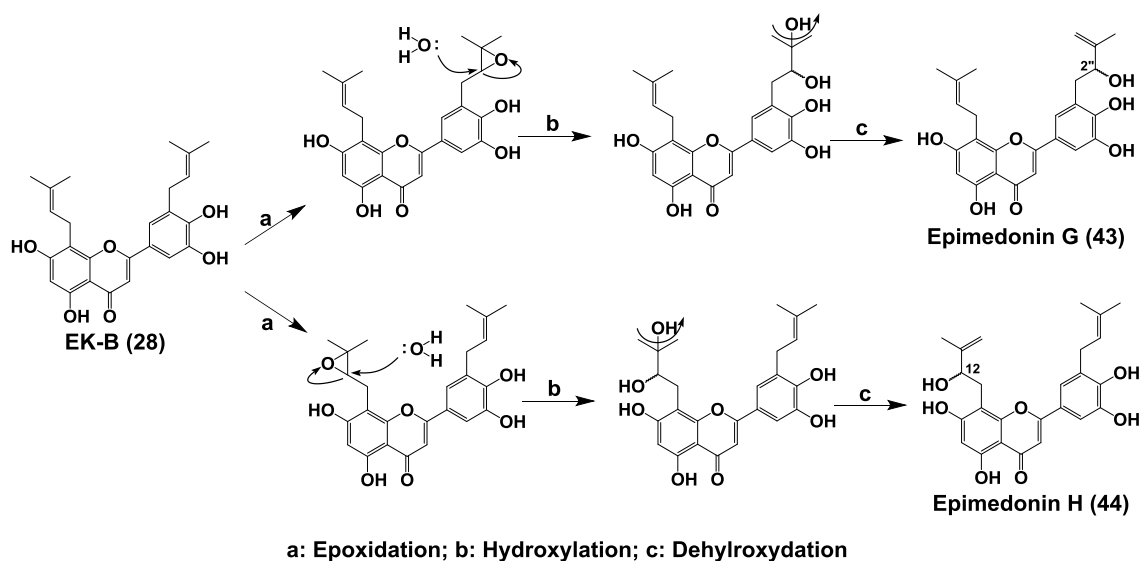


Fig. 47. Presumable biosynthesis pathway for epimedonin G (43) and H (44) from EK-B (28).

Epimedonin G (43), H (44) は、それぞれ 2'', 12 位に不斉炭素原子をもつ化合物で、ラセミ体として単離・構造決定された。活性を評価するために、キラルカラムによる光学分割を行い、光学活性体 epimedonin G1 (43-1), G2 (43-2) および epimedonin H1 (44-1), H2 (44-2) を単離、構造決定した。Epimedonin G1 (43-1), G2

(43-2) の 2''位、epimedonin H1 (44-1), H2 (44-2) の 12 位、および epimedokoreanin C1 (EK-C-1), C2 (EK-C-2) の 1''位, 2''位の不斉炭素の立体配置は MTPA エステルを合成し、改良モッシャー法を適用し決定することができた。なお、epimedokoreanin C (11) は立体化学不明で報告されていたが、今回、光学分割し絶対立体構造を決定できたことから、EK-C-1, EK-C-2 は光学活性な新規化合物として報告する予定である。

Epimedonin E (45), F (46) は EK-B (28) 由来の酸化誘導体で、プレニル基が A 環 7 位の水酸基と環を形成した化合物群である。環形成の際、経路 a のように A 環 7 位の水酸基がエポキシ環の 12 位へ求核攻撃した場合、先述した koreanoside H (35) と同様のメカニズムでフラン環を生成し、epimedonin E (45) が生成する。一方、経路 b のようにエポキシ環の 13 位側から求核攻撃した場合、ピラン環を生成し epimedonin F (46) が生合成されると推察している (Fig. 48)。

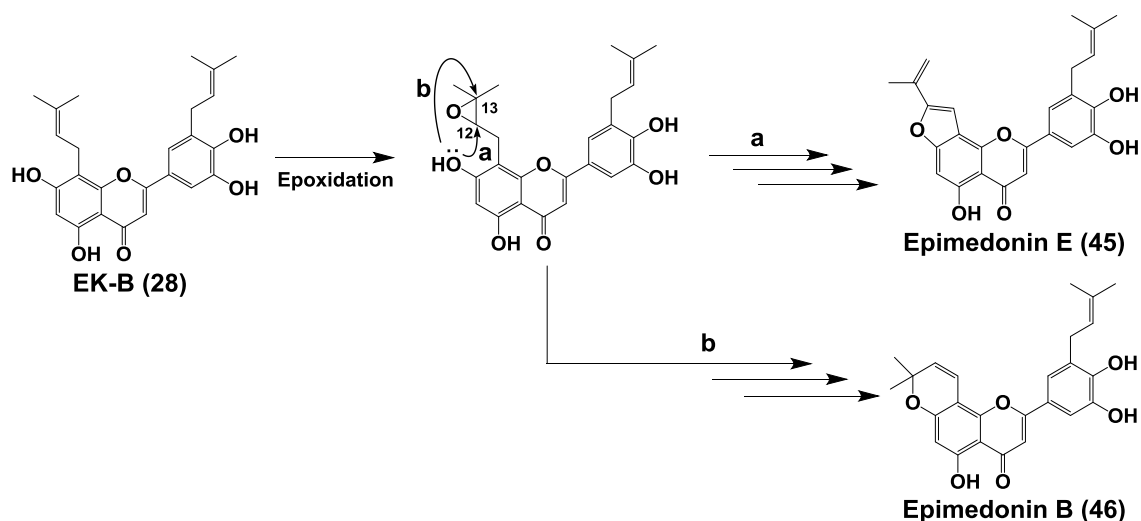


Fig. 48. Presumable biosynthesis pathway for epimedonin E (45) and F (46) from EK-B (28).

第3章 イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CML, CMA 生成阻害活性試験

3-1 イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CML, CMA 阻害活性のスクリーニング

3-1-1 イカリソウ由来の活性試験用サンプルについて

本研究で単離・構造決定したイカリソウ由来プレニルフラボノイド 50 個のうち、サンプル量が確保できた 35 個について、1 mM の DMSO 溶液を調製し、CML, CMA 生成阻害活性サンプルとした (Table 9)。

Table 9. Prenylflavonoids from *Epimedii Herba* used for inhibiting activity test against CML and CMA formation.

No.	Compound name	No.	Compound name
1	Icariin (12)	19	*Koreanoside G (37)
2	Icariside I (21)	20	*Koreanoside H (38)
3	Icariside II (17)	21	*Epimedonin E (45)
4	Icarisoside A (18)	22	*Epimedonin G (43)
5	Epimodoside C (1)	23	Epimedokoreanin C (11)
6	Limonianin (30)	24	*Epimedonin H (44)
7	8, 5'-diprenylapigenin (26)	25	Epimedin C (5)
8	Epimedokoreanin B (28)	26	*Korepimodoside D (40)
9	8-prenyl luteolin (22)	27	*Korepimodoside E (41)
10	Broussonol D (27)	28	*Korepimodoside F (42)
11	Euchrestaflavanone A (24)	29	Epimedokoreanoside I (10)
12	Sagittatoside A (13)	30	Epimedin K (7)
13	Korepimodoside A (19)	31	Epimedin L (8)
14	*Koreanoside E1 (35)	32	Caohuoside B (9)
15	*Koreanoside E2 (36)	33	Epimedin I (6)
16	Epimedonin C (25)	34	Epimedin A (3)
17	*Epimedonin F (42)	35	Epimedin B (4)
18	*Koreanoside F (34)		* New compound

3-1-2 CML, CMA 生成阻害活性試験の方法

リボース（最終濃度 30 mM）とゼラチン（最終濃度 2.0 mg/mL）を、pH 7.4 に調整した 10 mM phosphate buffer（以下 PBS）に溶解させた反応液を CML 生成に用いた。一方、同様にリボースとゼラチンを 100 mM sodium phosphate buffer（以下 Na-PB）に、溶解させた反応液を CMA 生成に用いた。サンプル溶液は、DMSO 濃度を 10% 以下になるように反応液に加えた。また、サンプル溶液の代わりに、DMSO のみを反応液に加えられたものをコントロール、その溶液を冷蔵庫で保管したものを day 0 とした。先ず、それぞれサンプルを加えた反応液は、常法に従い、37 °C で 7 日間インキュベーションした^{28,34}。次に、各反応溶液で生成した CML, CMA の量を ELISA 法で測定した。Fig. 49 に示すように、各反応液を PBS で 200 倍希釈し、ゼラチン濃度を 10 µg/mL に調整した。次に、希釈した反応液は、96 穴マイクロプレートに分注し、室温で 2 時間静置した後、Washing buffer (PBS in 0.05% Tween20) で 3 回洗浄した。次に、0.5% ゼラチン溶液を用いてウェルをブロッキングし、1 時間室温で静置した。余分なゼラチンを洗浄後、1 次抗体（モノクローナル抗 CML、CMA 抗体）を、それぞれ 0.1 µg/mL、1 µg/mL になるように Washing buffer で希釈後、各ウェルに添加し、室温で 1 時間静置した。次に、各ウェルを洗浄後、Washing buffer を用いて 5000 倍希釈した 2 次抗体（IgG 抗体）を添加し、室温で 1 時間静置した。最後に、各ウェルを OPD 染色し、マイクロプレートリーダーで 492 nm の吸光度を測定し CML, CMA の生成量を測定した。

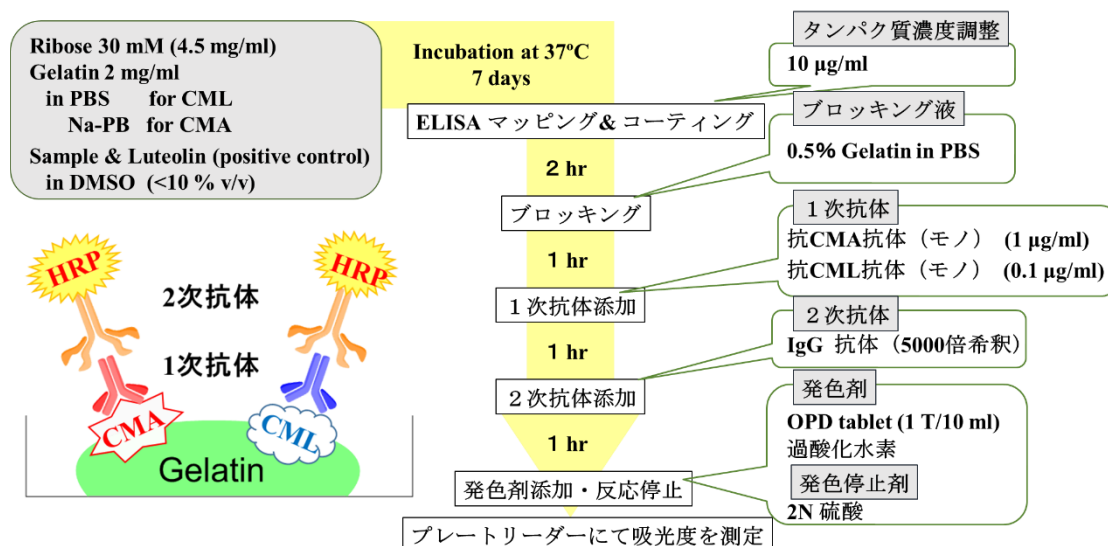


Fig. 49. Determination of CML & CMA content by ELISA method.

3-1-3 イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CML, CMA 生成阻害作用の検討

イカリソウより単離した 35 種のプレニルフラボノイド (Table 9) は、それぞれ最終濃度が 100, 10, 1.0 μM になるように調整し、ゼラチンとリボースを用いた評価系に添加し、CML 生成阻害作用を、抗 CML 抗体を用いた ELISA 法にて評価した。対照薬として、AGEs 生成阻害活性作用が報告されている pyridoxamine (PM)⁵⁹ と luteolin²² を用いた (Fig. 50)。

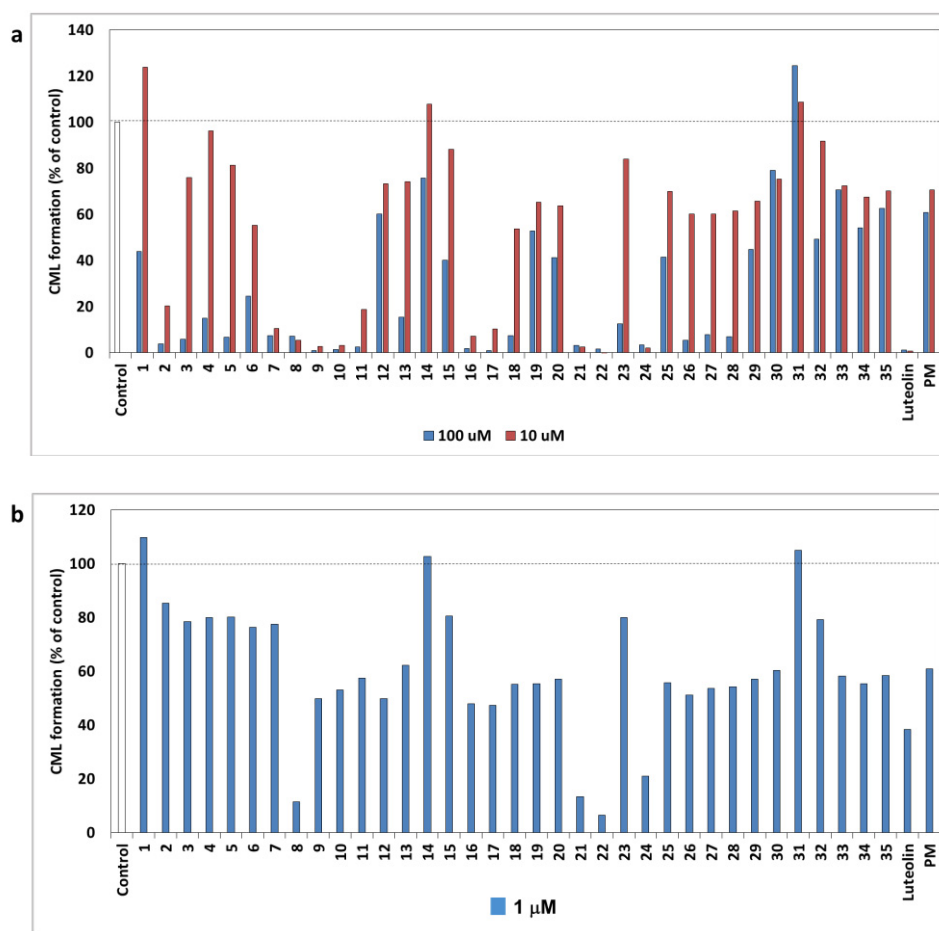


Fig. 50. Effect of compounds from *Epimedii Herba* on CML formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with the compounds (a: 100, 10 μM , b: 1.0 μM) in 10 mM phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CML content was determined using noncompetitive ELISA.

その結果、8, 5'-diprenyl apigenin (7)、epimedokoreanin B (8)、8-prenyl luteolin (9)、broussonol D (10)、epimedonin C (16)、epimedonin E (21)、F (17)、G (22)、H (24) に 10 μM で 80 % 以上の強い CML 生成阻害活性が確認された (Fig. 50a)。CML 阻害活性の顕著なこれら 9 個のプレニルフラボノイドの共通点は、アグリコンであ

る。さらに、詳細に阻害活性の有無を比較するために、サンプル濃度を 1.0 μM にして検討を行ったところ、epimedokoreanin B (8), epimedonin E (21), G (22), H (24) の 4 種の化合物に、対照薬として用いた PM、luteolin よりも強い阻害率 80 % 以上の活性が観測された (Fig. 50b)。

また、CML の阻害活性試験と同様に、CMA 生成阻害活性の検討を行った (Fig. 51)。その結果、epimedokoreanin B (8), epimedonin E (21), G (22), H (24) の 4 種の化合物に、10 μM の濃度において 80 % 以上の強い CMA 生成阻害活性が観測された (Fig. 51a)。本実験においても、CML 阻害活性の傾向と同様に、配糖体よりもアグリコンの方が生成阻害活性が強いことが判明した。一方、サンプル濃度を 1.0 μM に減らして CMA 生成阻害実験を行ったところ、epimedokoreanin B (8), epimedonin E (21)、G (22) に弱いながら阻害活性が観測されるものの、その他の化合物に関しては、生成阻害活性は確認できなかった (Fig. 51b)。

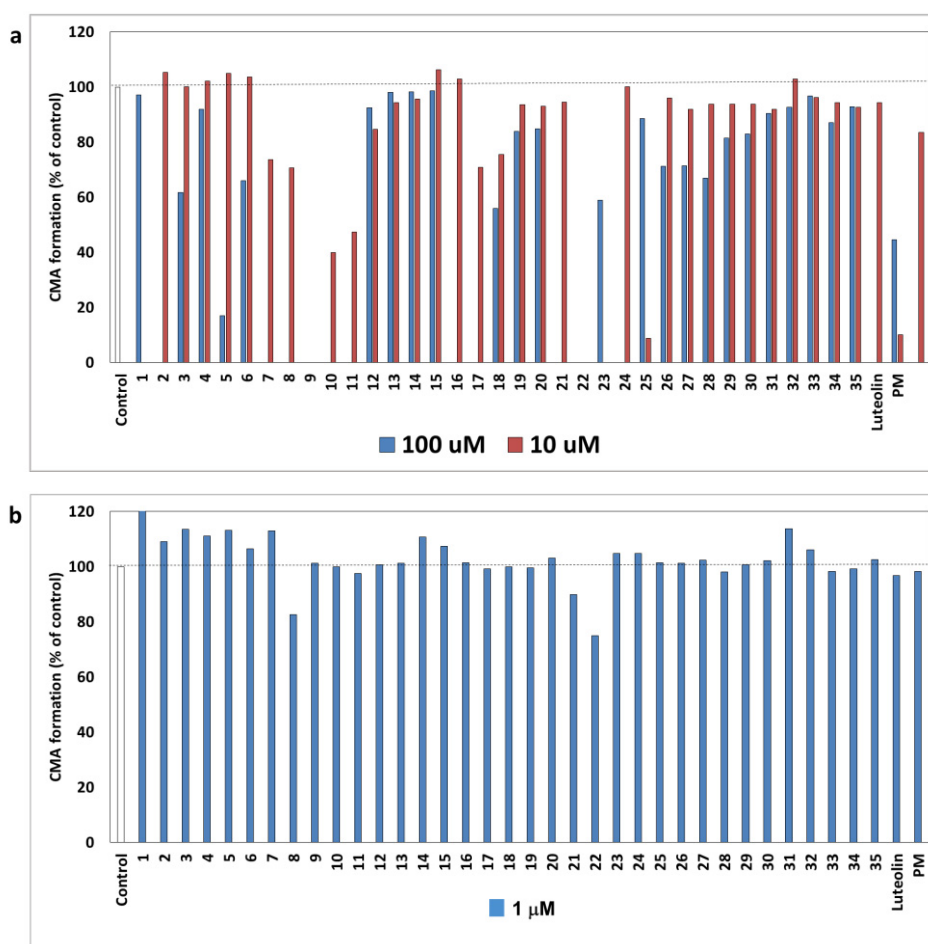


Fig. 51. Effect of compounds from *Epimedii Herba* on CMA formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with compounds (a: 100 and 10 μM , b: 1.0 μM) in 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CMA content was determined using noncompetitive ELISA.

最後に、CML, CMA 生成阻害活性試験において、対照薬の PM, luteolin よりも顕著な阻害活性の観測された epimedokoreanin B (8)、epimedonin E (21), G (22), H (24) (Fig. 52) について、 $n=3$ で実験を行った (Fig. 53)。その結果、生成阻害活性の再現性を確認することができた。また、活性の見られた化合物の構造式に共通することは、A, B 環にそれぞれプレニル基を持つこと、B 環にカテコール基を有していることである。

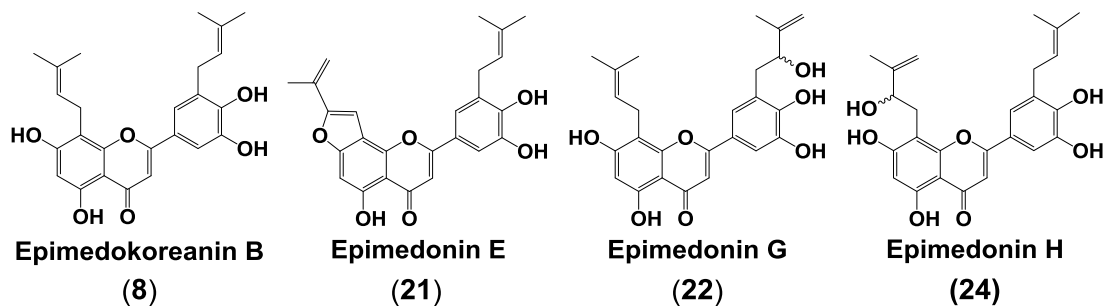


Fig. 52. The structures having strong inhibition activity of CML and CML formation.

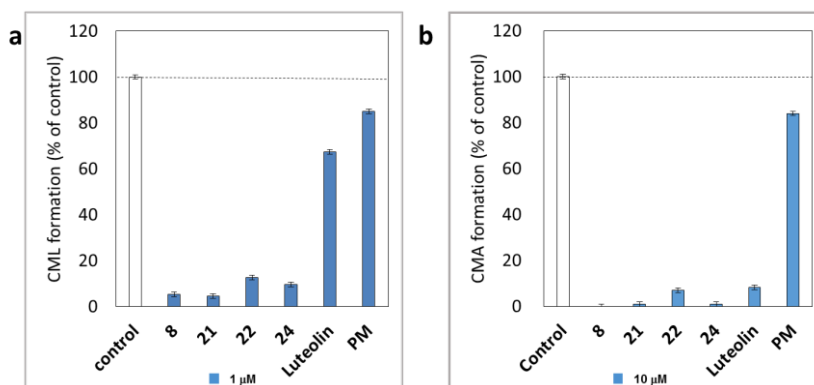


Fig. 53. Effect of strong inhibition activity compounds on CML (a) and CMA (b) formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and glyoxal (5 mM) were incubated with compounds (a: 1.0 μ M, b: 10 μ M) in (a) 10 mM phosphate buffer; in (b) 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CML and CMA content was determined using noncompetitive ELISA. Data are presented as the mean \pm SD.

3-2 グリオキサールによる CML, CMA 生成に対する阻害活性の検討

一般に、AGEs の生成経路は、還元糖とタンパク質が反応して生成するアマドリ転位物に由来する経路が主要であるが、中間体アルデヒドに由来する経路からも AGEs は生成することが知られている(Fig. 54)^{29, 30, 67}。

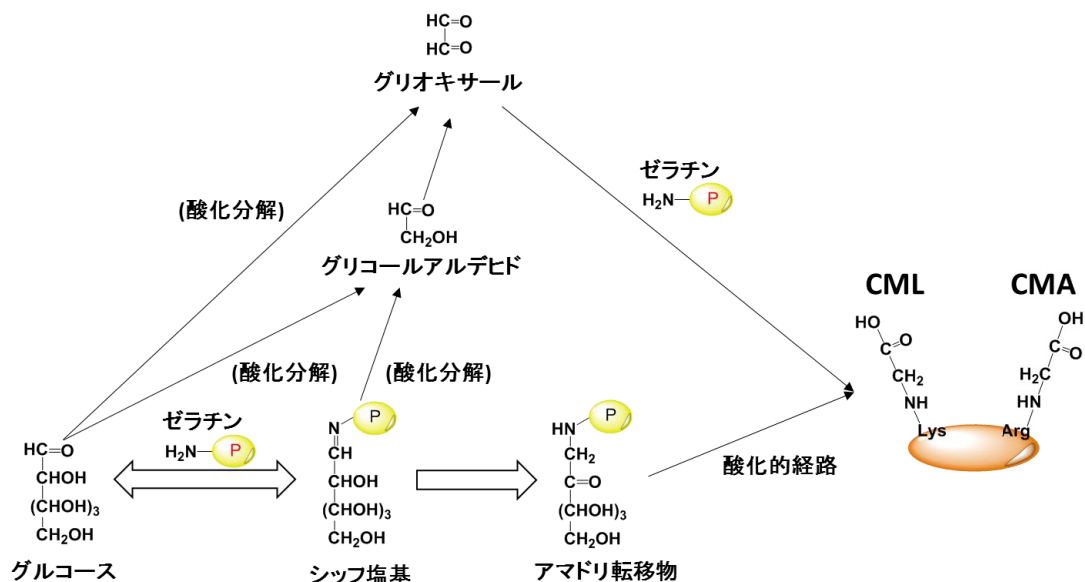


Fig. 54. Alternative routes for the formation of CML and CMA *in vitro* and *in vivo*.

よって CML、CMA 生成阻害剤の作用点として、還元糖から生成するアマドリ転位物に由来する経路を抑制する他に、CML、CMA 生成に関わる主要な中間体アルデヒドであるグリオキサールに由来する経路を抑制する可能性が考えられる。そこで、前節 (3-1) で CML、CMA 生成阻害活性の顕著な化合物である epimedokoreanin B (以下 **EK-B (8)**) について、グリオキサール経路により生成する CML、CMA 生成阻害活性の検討を行った。

方法としては、グリオキサールとゼラチンの混合溶液に、**EK-B (8)** (100, 10, 1 μ M) を加え、37°C で 3 日間インキュベートした。**EK-B (8)** を加えないコントロールに対する CML, CMA 生成阻害活性を、抗 CML, CMA 抗体を用いた ELISA 法にて評価した (Fig. 55)。

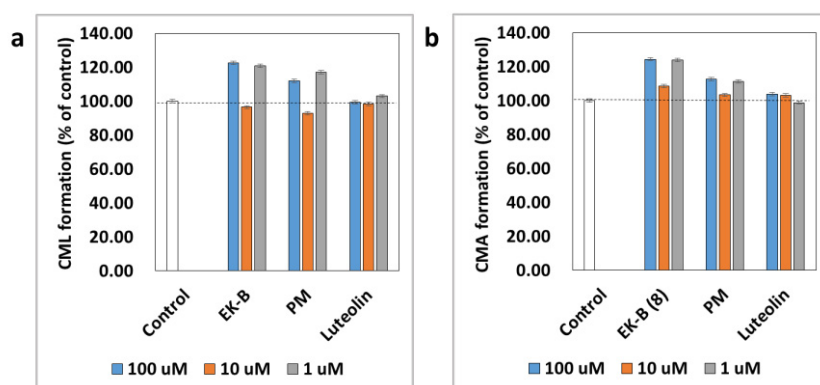


Fig. 55. Effect of EK-B (8) on CML (a) and CMA (b) formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and glyoxal (5 mM) were incubated with **EK-B** (100, 10, and 1 μ M) in (a) 10 mM phosphate buffer; in (b) 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CML and CMA content was determined using noncompetitive ELISA. (mean \pm SD, n=3)

その結果、ゼラチンとグリオキサールを用いた評価系では、どの濃度 (100, 10, 1 μ M) においても **EK-B (8)** の CML, CMA 生成阻害作用は認められなかった。ゆえに、イカリソウ由来のプレニルフラボノイドは、中間体アルデヒドに由来する経路ではなく、主要な AGEs 生成経路である還元糖のアマドリ転位物に由来する経路を阻害することで CML, CMA の生成を阻害することが示唆された。

3-3 I型コラーゲンに生成する CML, CMA の阻害活性の検討

ゼラチンの代わりに、実際に真皮に存在する I型コラーゲンを用いて、CML, CMA 生成阻害試験を行った。本実験には、ゼラチンによる評価系で顕著な阻害活性がみられた、**EK-B (8)**、epimedinin E (**21**)、G (**22**)、H (**24**) の 4 種類の化合物を用いた。

方法として、リボース (30 mM) と I型コラーゲン (1.5 mg/mL) の混合溶液にプレニルフラボノイド (**8, 21, 22, 24**) を添加し、37 °C で 7 日間インキュベーションした後、モノクローナル抗 CML, CMA 抗体を用いた ELISA 法により I型コラーゲンに生成した CML, CMA 量を測定した (Fig. 56)。

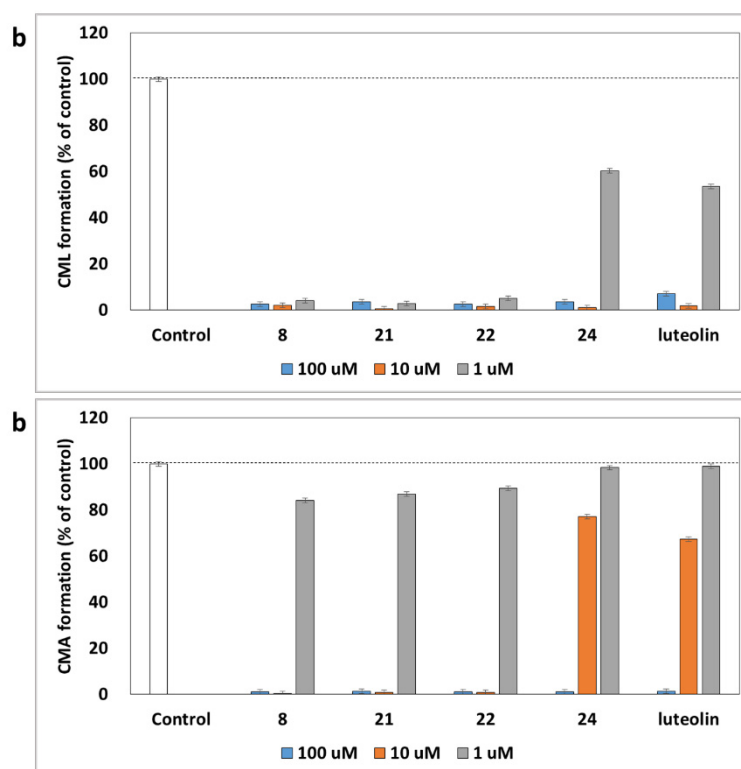


Fig. 56. Effect of compounds from *Epimedii Herba* on CML (a) and CMA (b) formation.

Type I collagen (1.5 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with the compounds (100, 10, and 1 μ M) in (a) 10 mM phosphate buffer; in (b) 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CML and CMA content was determined using noncompetitive ELISA. (mean \pm SD, n=3)

その結果、イカリソウ由来のプレニルフラボノイドの4種の化合物はCML, CMAの両方で顕著な阻害活性が観測された。特に、EK-B (8), epimedinonin E (21), G (22)では、1 μ Mの濃度でもほぼ完全にCML生成を阻害している (Fig. 56a)。また、これらの化合物は、10 μ Mの濃度でCMAを完全に阻害している (Fig. 56b)。一方、epimedinonin H (24)は、対照薬として用いたluteolinと同等のCML, CMA生成阻害活性が観測された。

ゼラチンはコラーゲンを加水分解して可溶化したものであり、コラーゲンとはアミノ酸配列は同じであるが、立体構造が異なっている。これら4種のイカリソウ由来プレニルフラボノイド (Fig. 52)のCML, CMA生成阻害活性は、立体構造の違いコラーゲンにおいても同様に観測された。つまり、凡庸性のタンパク質として用いたゼラチンを用いても、高価なコラーゲンと同様の阻害活性を再現できた。よって、プレニルフラボノイドのCML, CMA生成阻害活性スクリーニングにおいてはゼラチンを用いる有用性が確認できた。

3-4 小括

イカリソウ由来プレニルフラボノイド 35 個について、先ずゼラチンとリボースを用いた評価系で CMA, CML の生成阻害活性試験を行った。CML 生成阻害活性試験の結果、8, 5'-diprenyl apigenin (7), epimedokoreanin B (8), 8-prenyl luteolin (9), broussonol D (10), epimedonin C (16), epimedonin E (21), F (17), G (22), H (24) に 10 μ M で 80 % 以上の強い生成阻害活性がみられた (Fig. 50)。また、CMA 生成阻害において、CML 生成阻害活性が顕著な化合物と同様の化合物に、100 μ M で強い CMA 生成阻害活性を確認した (Fig. 51)。活性を評価した化合物を配糖体とアグリコンで分割すると (Fig. 57)、CML, CMA 生成阻害活性はどちらもアグリコンの方が強い傾向にある。即ち、CML 生成阻害活性の強い化合物は、CMA 生成阻害活性も同様に強く、特に 3 位に酸素官能基を持たないフラバノン骨格のアグリコンに強い CML, CMA 生成阻害活性が観察された (Fig. 58)。

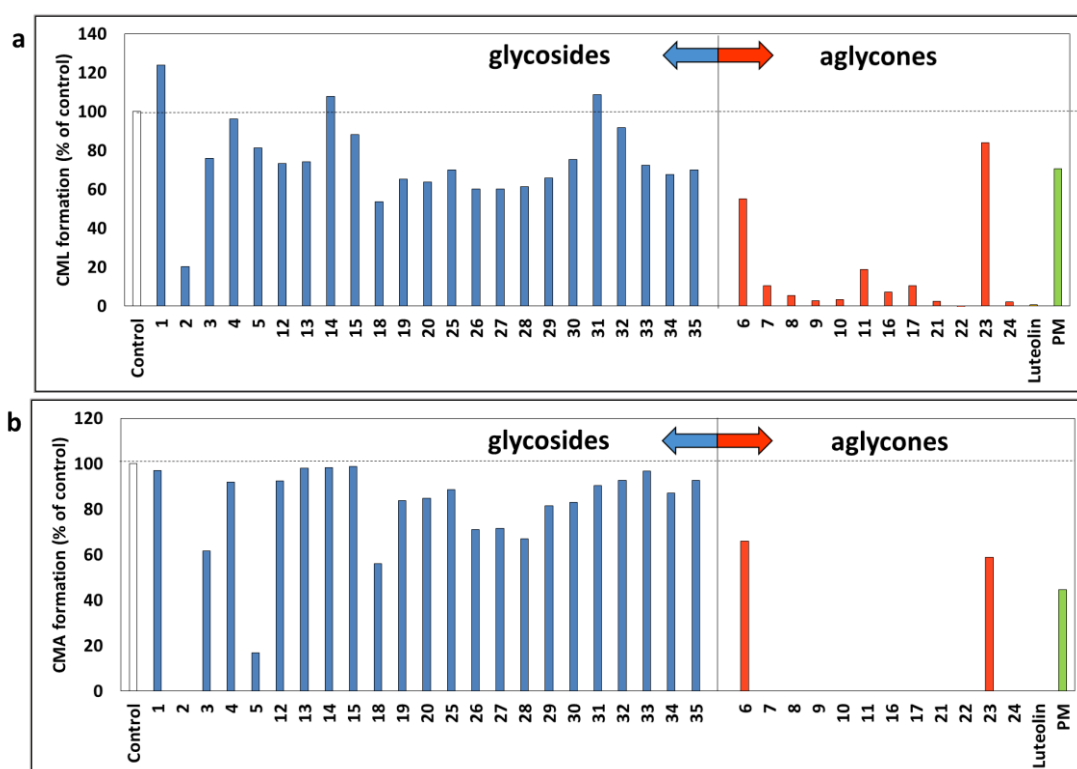


Fig. 57. Summary of the result of inhibition activity against CML and CMA formation.

Blue bar: prenylflavonoid glycosides, red bar: prenylflavonoid aglycones.

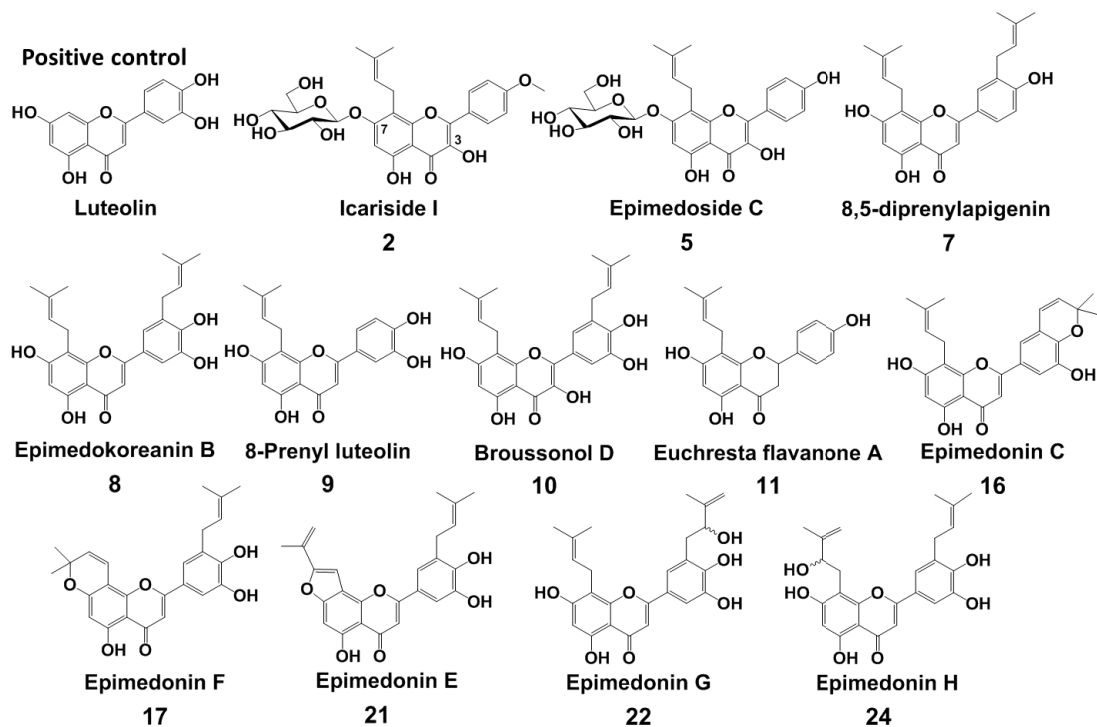


Fig. 58. Structures of prenylflavonoids having inhibition activity against CML (at 10 μ M) and CMA (at 100 μ M) formation.

しかしながら、配糖体でもフラボノール骨格 7 位のみグルコースが結合した icariside I (2), epimedeside C (5) には活性が観測された (Fig. 58)。一方、アグリコンでも limonianin (6), epimedokoreanin C (EK-C, 23) には活性は認められなかった (Fig. 59)。Icariside I (2) と limonianin (6) の構造は、B, C 環は共通であるが、2 の A 環部分が γ,γ -dimethylallyl 基から 6 の dimethylpyrane 環に変わると活性が著しく低下することが判明した。また、6 と epimedinonin C (16) を比較すると、16 は B 環に dimethylpyrane 環を形成しても活性を示す。一方、16 と A, C 環部分が共通の EK-C (23) であるが、B 環が cyclopentane 環となると活性が顕著に低下することが観測された。

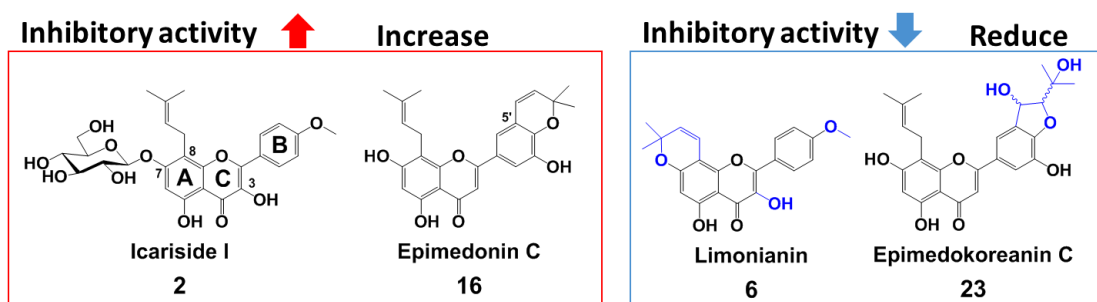


Fig. 59. Comparison with inhibitory activity rate of icariside I (2), limonianin (6), epimedinonin C (16), and EK-C (23).

さらに低濃度で活性を比較すると、epimedokoreanin B (8), epimedonin E (21), G (22), H (24) (Fig. 60)は、1 μM においても対照薬として用いた PM, luteolin よりも強い CML 阻害活性が観察された。また、この4種の化合物は、10 μM で80%以上の強い CMA 生成阻害活性が観測された。以上の結果より、CML, CMA 生成阻害活性がどちらも顕著なプレニルフラボノイドに共通する化学構造は、luteolin 型フラバノン骨格のアグリコンであり、A 環 8 位、B 環 5' 位にプレニル基、ならびに B 環にカテコール基を有することである (Fig. 60)。

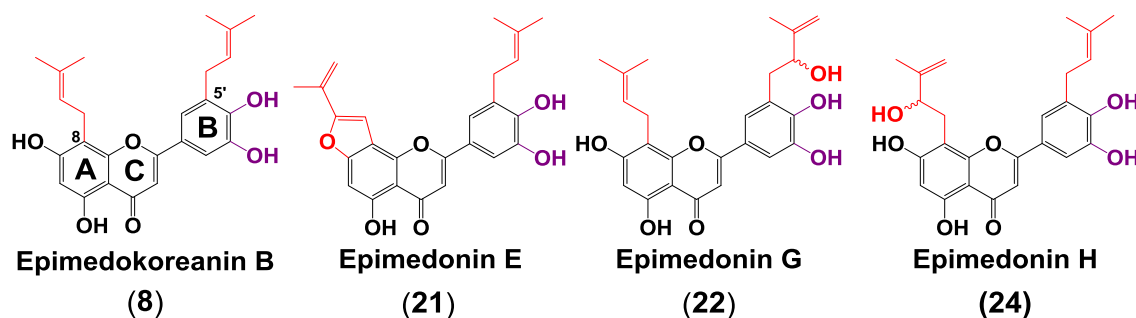


Fig. 60. Structures of prenylflavonoids having strong inhibition activity against CML (at 1.0 μM) and CMA (at 10 μM) formation.

次に、CML, CMA 生成阻害作用機序を解明するために、従来のゼラチンとリボースを用いた評価系に代えて、中間体アルデヒド体メチルグリオキサールとゼラチンの組み合わせ、ヒト真皮の主成分である I 型コラーゲンとリボースの組み合わせを用いて、CML, CMA 生成阻害活性の検討を行った。その結果、イカリソウ由来のプレニルフラボノイドは、中間体アルデヒドを経て生成する CML, CMA の生成を阻害するのではなく、主要な AGEs 生成経路である還元糖のアマドリ転位物に由来する経路を阻害することが判明した。また、ゼラチンを用いた系で活性の強い4種のプレニルフラボノイドは、3次元構造を形成している I 型コラーゲンにおいても強い CML, CMA 生成阻害活性を維持することが判明した。

第4章 CML, CMA 生成阻害活性プレニルフラボノイドの構造活性相関の検討

本章では3章で得られた知見を元に、顕著な阻害活性を示した **EK-B (8)** のどのユニットが CML, CMA 生成阻害活性に重要なのか、さらに詳細に検討した。また、前章 (2-4-3) において、epimedonin G (**22**), H (**24**) を光学分割して得られた epimedonin G1, G2 と H1, H2 の CML, CMA 生成阻害活性に違いがあるか検討した。

4-1 カテコール構造の重要性の検討

3章で CML, CMA 生成阻害活性の顕著な化合物 (Fig. 60) は、すべてカテコール基が含まれていた。そこで、カテコール基の重要性を検討するために、最も強い阻害活性を有し、収量も多い epimedokoreanin B (**EK-B**) の水酸基をメチル化し、その CML, CMA 生成阻害活性を測定した。まず、**EK-B** に4つあるフェノール水酸基をジアゾメタンで部分メチル化した。反応をシリカゲル TLC でモニターし、完全メチル体 (**49**) が生成したところで反応を停止した (Fig. 61)。得られた部分メチル化体を含む混合物は、シリカゲルで分離・精製し、原料回収とともに3種の生成物を単離した。

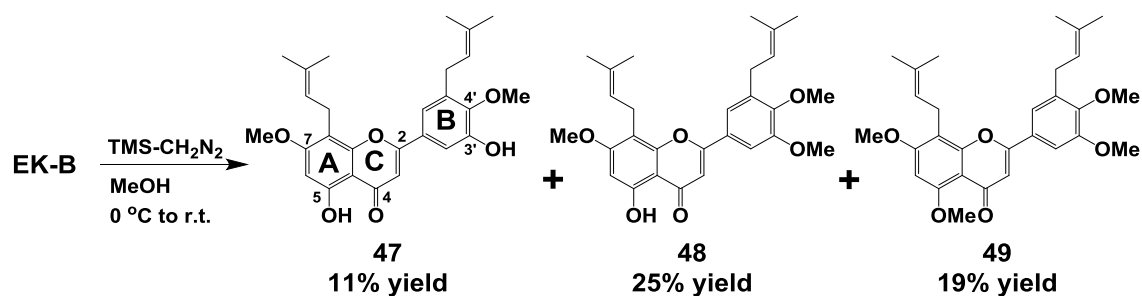


Fig. 61. Partial methylation of EK-B.

部分メチル体 **47**, **48** および完全メチル体 **49** の化学構造は、各種 NMR データより決定した。各化合物の収率は、**47** が 11%、**48** が 25%、**49** が 19% であった。得られた誘導体 (**47**~**49**) は、活性サンプルとして CML, CMA 生成阻害活性試験を行った (Fig. 62)。

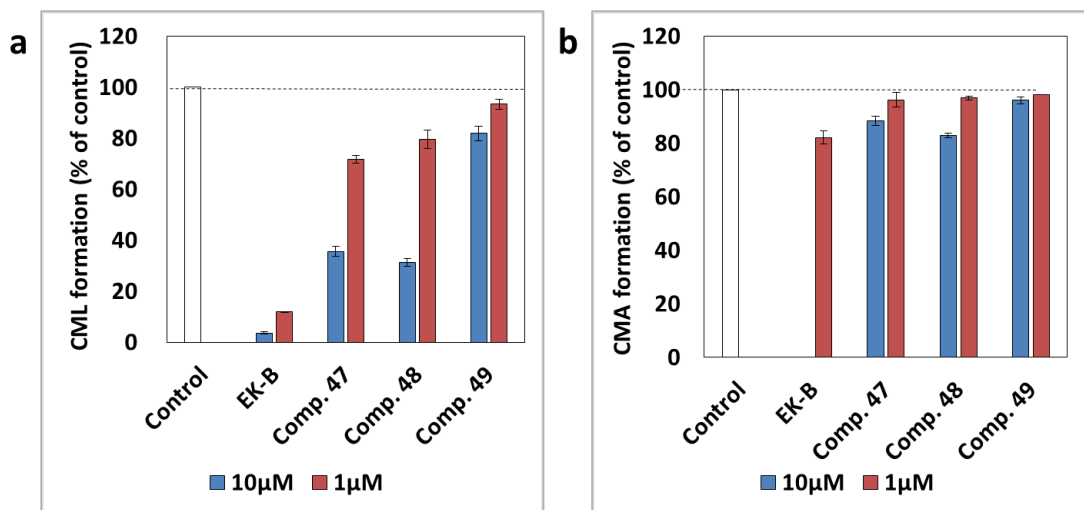


Fig. 62. Effect of methylated compounds (47, 48, and 49) derived from EK-B on (a) CML and (b) CMA formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with the compounds (10 μM and 1 μM) in (a) 10 mM phosphate buffer; in (b) 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CML and CMA content was determined using noncompetitive ELISA. Data are presented as the mean ± SD.

その結果、メチル化した化合物 47, 48, 49 のすべてで **EK-B** より活性が低下した。化合物 47, 48 と比較して、化合物 49 のように A 環 5 位に結合する水酸基がメチル化されると、CML 生成阻害活性 (Fig. 62a, 10 μM) が顕著に低下した。

次に、カテコール基を持つ単純な化合物として、食品成分としても有名な没食子酸 (**gallic acid**)、還元剤として、分析試薬として使われるピロガロール (**pyrogallol**)、抗酸化能が高いことで知られるクロロゲン酸 (**chlorogenic acid**) (Fig. 63) を用いて **EK-B** との活性の比較を行った (Fig. 64)。

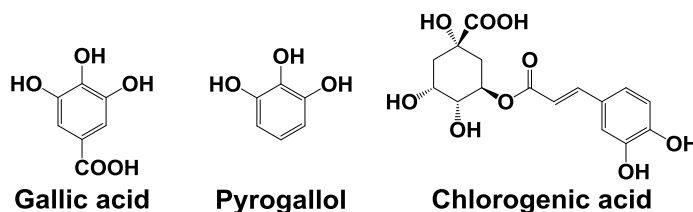


Fig. 63. Chemical structures of gallic acid, pyrogallol, and chlorogenic acid.

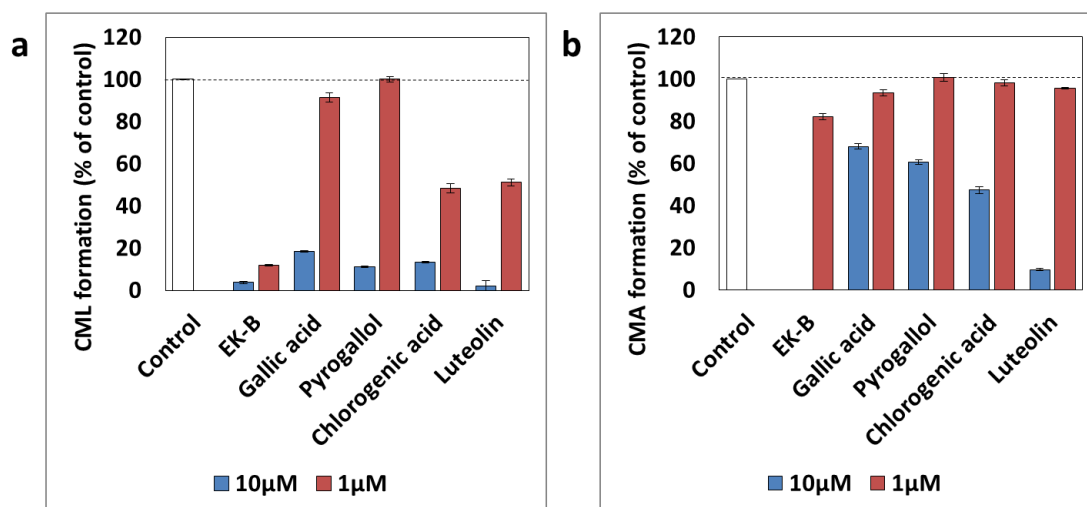


Fig. 64. Effect of compounds having catechol group on (a) CML and (b) CMA formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with the compounds (10 μM and 1 μM) in (a) 10 mM phosphate buffer; in (b) 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CML and CMA content was determined using noncompetitive ELISA. Data are presented as the mean ± SD.

この結果、CML 生成阻害試験において、10 μM では、没食子酸、ピロガロール、クロロゲン酸ともに **EK-B** と同様に 80% 以上の生成阻害作用が観測された (Fig. 64a)。また、1 μM では、どの化合物も **EK-B** より活性が弱いものの、クロロゲン酸は、対照薬として用いた luteolin と同程度の CML 生成阻害活性を有することが判明した。一方、CMA 生成阻害試験において、10 μM で、**EK-B** と luteolin が 80%以上の阻害作用を示すのに対して、没食子酸、ピロガロール、クロロゲン酸は 30~50% 程度の弱い生成阻害作用がみられた (Fig. 64b)。しかしながら、1 μM ではすべての化合物で阻害活性はみられなかった。

4-2 CML, CMA 生成阻害作用におけるプレニル基の重要性の検討

次に、強い阻害活性を有する **EK-B** のカテコール基以外の部分構造であるプレニル基に着目し、その CML, CMA 生成阻害活性への寄与を検討した。本実験においては、プレニル関連化合物として、プロポリス由来の主要成分であるアルテピリン C (**artepillin C**)、バックカリン (**baccharin**)、ドウルパニン (**drupanin**) (Fig. 65) の 3つのプレニル化桂皮酸誘導体を用いて阻害活性試験を行った (Fig. 66)。

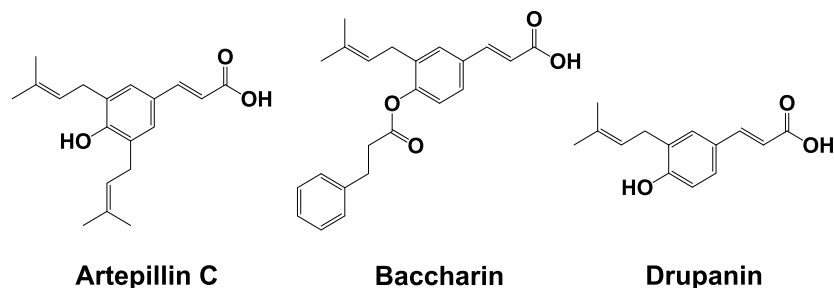


Fig. 65. Chemical structures of artepillin C, baccharin, and drupanin.

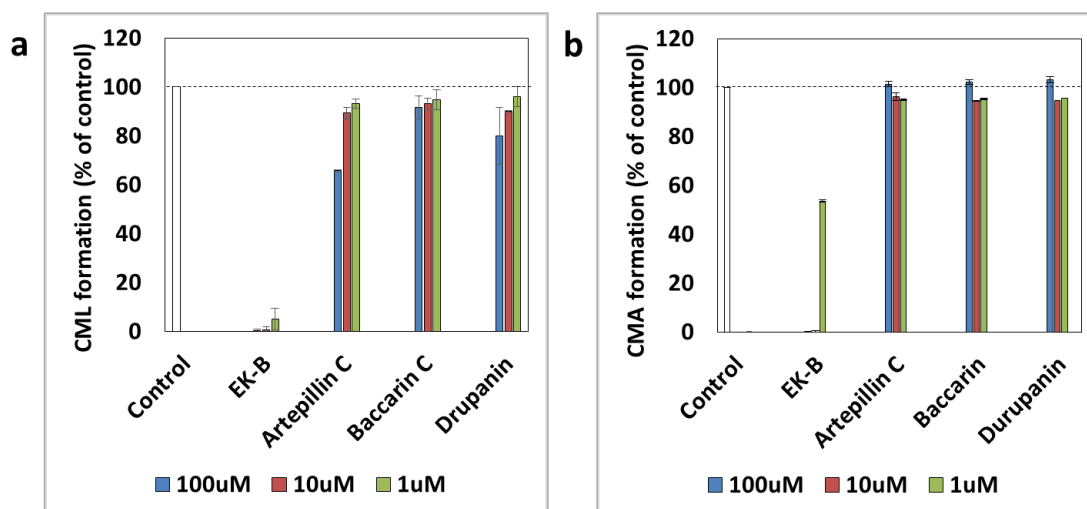


Fig. 66. Effect of prenylated cinnamic acid derivatives on (a) CML and (b) CMA formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with the compounds (100, 10, and 1 μ M) in (a) 10 mM phosphate buffer; in (b) 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CML and CMA content was determined using noncompetitive ELISA. Data are presented as the mean \pm SD.

その結果、Fig. 65 に示すように、今回使用したプレニル化桂皮酸誘導体には全く CML, CMA 生成阻害は観察されなかった。このことから、プレニル化された桂皮酸誘導体 (**artepillin C** はプレニル基 2 本、**drupanin** は 1 本) やその芳香族エステル (**baccharin**) 自体に活性があるのではなく、フェノール性水酸基を有するフラボノイド骨格にプレニル基が結合することで、CML, CMA 生成阻害作用がより強くなることが示唆された。

4-3 光学異性体の CML, CMA 生成阻害作用の比較

Epimedinonin G (**22**), H (**24**) はラセミ体として得られ、プレニルフラボノイドの中で CML、CMA 生成阻害活性が強い化合物と判明した。2 章では、これら二つの化合物について、CML、CMA 生成阻害活性を比較できるように、ラセミ体をキラルカラムにより光学分割し、改良モッシャー法でそれぞれの光学異性体の絶対立体構造を決定した。そこで、得られた光学活性体 epimedinonin G1, G2、ならびに epimedinonin H1, H2 (Fig. 67) を用いて CML, CMA 生成阻害活性を検討した (Fig. 68)。

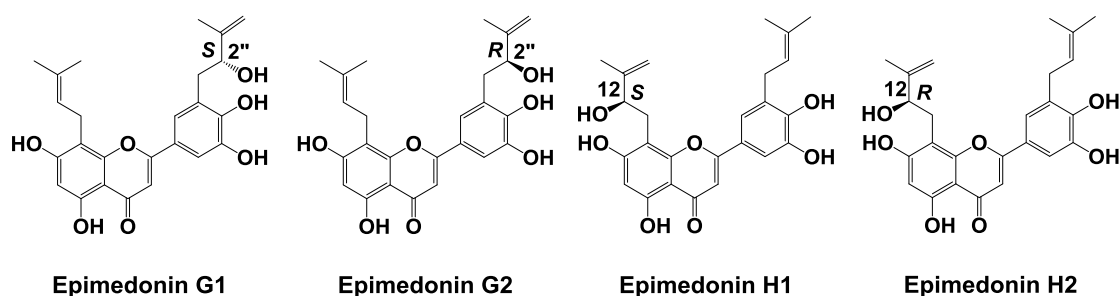


Fig. 67. Chemical structures of epimedinonins G1, G2 and H1, H2.

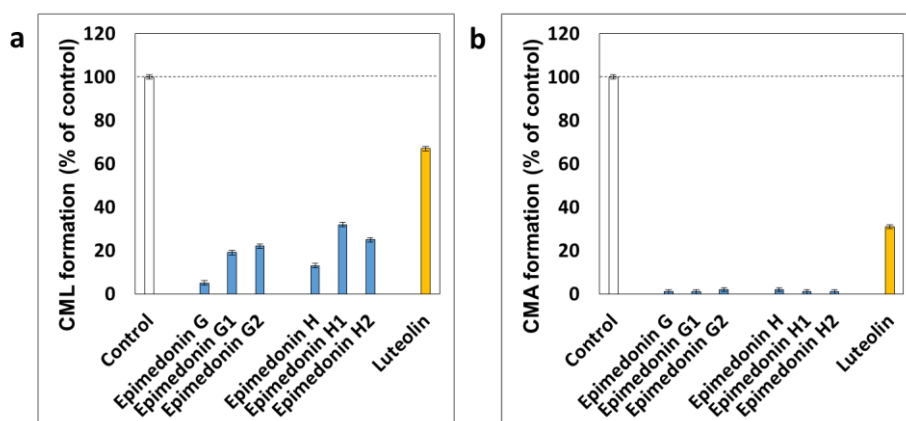


Fig. 68. Effect of optical active compounds from epimedinonin G (**23**) and H (**25**) on (a) CML and (b) CMA formation. Gelatin (2.0 mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with the compounds (a : 1 μ M; b: 10 μ M) in (a) 10 mM phosphate buffer; in (b) 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CML and CMA content was determined using noncompetitive ELISA. Data are presented as the mean \pm SD.

光学異性体の関係にある epimedinonin G1 (*S* 体) と G2 (*R* 体)、並びに epimedinonin H1 (*S* 体) と H2 (*R* 体) と、ラセミ体の epimedinonin G (**22**) と H (**24**) の CML, CMA 生成阻害試験を行った (Fig. 68)。その結果、CML, CMA どちらの生成阻害活性試験においても、生成阻害活性がどちらかの光学活性化合物に偏ることなく、ラセミ体と同程度であった。

4-4 小括

CML, CMA 生成阻害活性が強いプレニルフラボノイドにはすべてカテコール基が含まれているため、本章ではカテコール基の重要性を検討するために、先ず **EK-B** を用いて、ジアゾメタンによるフェノール性水酸基のメチル化を行い、メチル基の数が異なる 3 つのプレニルフラボノイド誘導体 (**47~49**) を得た。化合物 **47~49** の CML, CMA 生成阻害活性を行った結果、全てのプレニルフラボノイド誘導体で **EK-B** より CML, CMA 生成阻害活性が低下した。特に、フラボノイド骨格 B 環 5 位の水酸基がメチル化された化合物 **49** は、活性が顕著に低下した (Fig. 69)。

さて、B 環 5 位の水酸基が残存している化合物 **48** と完全メチル化体 **49** をシリカゲル TLC (Hexan: acetone= 2:1 (v/v)) 分析を行ったところ、化合物 **48** の *R_f* 値は 0.75 であるのに対し、化合物 **49** では 0.20 と小さい。さらに、HPLC 分析 (カラム: YMC C₁₈ (φ 10×250 mm); 流速: 2.0 mL/min; 温度 40°C; 検出: RI) において、化合物 **48** の保持時間 19.9 min に対して化合物 **49** は 14.5 min と短くなっている。このように、A 環 5 位の水酸基がメチル化されると、C 環 4 位のカルボニル酸素との水素結合が失われることで、化学的性質 (物性) に顕著な変化が生じている。

EK-B の各種メチル体を合成し、CML, CMA 生成阻害活性を比較した結果、フラボノイド B 環のカテコール基の重要性が再確認されるとともに、フラボノイド骨格の A 環 5 位の水酸基と C 環 4 位のカルボニル基との水素結合が、CML, CMA 生成阻害活性に重要であることが推察された。

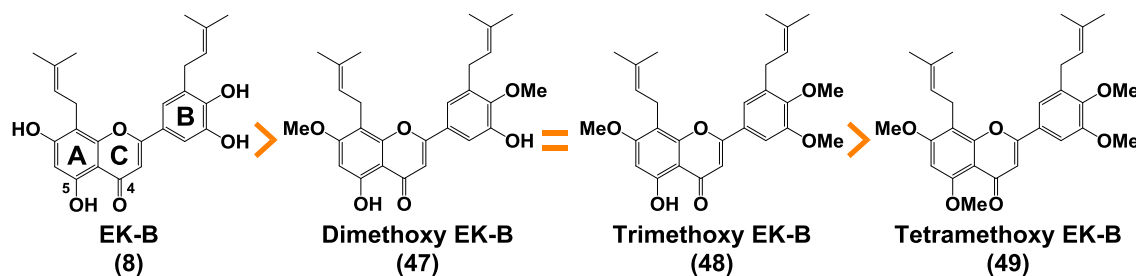


Fig. 69. Comparison with inhibitory activity rate of EK-B and that of the methylated derivatives.

さらに、カテコール基を持つ単純な 3 つの化合物 (**gallic acid**, **pyrogallol**, **chlorogenic acid**) と **EK-B** について CML, CMA 生成阻害活性を比較したところ、**EK-B** が最も阻害活性が強いことが明らかとなった。よって、B 環のカテコール基が単独で阻害活性を担っているのではなく、他の部分構造のプレニル基や C 環部分の構造も活性発現には重要であることが判明した。そこで、プレニル基の重要性を検討すべく、プロポリス由来の **artepillin C**, **drupanin**, **baccharin** を用いて CML, CMA 生成阻害活性を検討した。しかし、どの化合物にも CML, CMA 生成阻害活性

は確認できなかった。このことから、フラボノイド骨格にプレニル基が結合することで、CML, CMA 生成阻害作用がより強くなることが推察された (Fig. 70)。

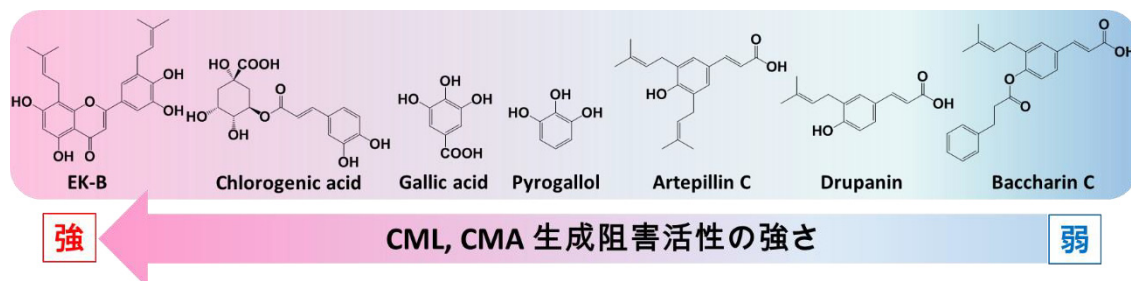


Fig. 70. Comparison with inhibitory activity rate of EK-B and that phenolic compounds (gallic acid, pyrogallol, chlorogenic acid), prenylated compounds (artepillin C, drupanin, baccharin).

最後に、光学異性体間の CML, CMA 生成阻害活性の有無を、2 章で得られた epimedonin G, G1, G2 および H, H1, H2 を用いて検討した。その結果、多少の活性の差はみられるが、光学異性体間に顕著な CML, CMA 生成阻害の差は観測されず、どちらの立体に活性が偏ることなく、強力に CML, CMA の生成を阻害することが明らかとなった (Fig. 68)。

以上の結果をまとめると、

- フラボノイド骨格にあるフェノール性水酸基、特にカテコール基は活性発現に必須である。
- フラボノイド骨格の A 環 5 位の水酸基と C 環 4 位のカルボニル基との水素結合が活性を維持するために重要である。
- カテコール基を持つフラボノイド骨格の A 環 8 位と B 環 5' 位にプレニル基が結合すると活性が増加する。
- 光学異性体の関係にあるプレニルフラボノイドの CML, CMA 生成阻害活性はプレニル基部分の立体化学に依存しない。

総括

世界規模での人口の高齢化が著しい近年、「健康で長生きする」という人類の根源の欲求を追及する上で、「未病」の維持を目的とする予防医学的な対策が重要な役割を担い始めてきている。著者らの研究室では、これまでに医食同源の観点より、様々な植物由来の有効成分の探索研究を行ってきている。本研究において、著者は、糖尿病合併症やアテローム性動脈硬化症など生活習慣病、並びに、骨粗鬆症やアルツハイマー病などの老化性疾患の発症や進展に関与する終末糖化生成物 Advanced glycation end products (AGEs) の生成を阻害する天然有機化合物を発見し、予防医学に貢献することを目指している。

コラーゲンは真皮、靭帯、腱、骨、軟骨などを構成する主要なタンパク質の一つであり、コラーゲンの AGEs 化は皮膚老化や骨粗鬆症の発症や進展のリスクなどにつながるという報告がある。そこで、本研究では、コラーゲン蓄積と病態との関連が明らかにされている AGEs 構造体である N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine (CML)、並びに、コラーゲン特異的に生成する AGEs 構造体である N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) の2つのコラーゲン関連の AGEs 構造体に着目した。そして、CML, CMA の生成を阻害することで、生活習慣病や老化性疾患の発症や進展を予防・改善する天然素材とその活性成分を明らかにすることを目的として研究を行った。まず初めに、医食同源の観点より選抜した天然物抽出エキス 42 種について、CMA 生成阻害活性の測定を、抗 CMA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法で行った。その結果、イカリソウ (*Epimedium Herba*) エキスに最も強い CMA 生成阻害活性が観測された。そこで、イカリソウに含まれる CML, CMA 生成を阻害する天然有機化合物の探索を企図した。

まず、ウチダ和漢薬より購入したイカリソウをメタノール抽出し、CML, CMA 生成阻害活性を指標に各種カラムクロマトグラフィーを駆使して分離精製し、50 個のプレニルフラボノイドを単離した。得られた化合物は、各種スペクトルデータ (NMR など) を中心に化学構造の決定を行った。その結果、既知プレニルフラボノイド 30 個を同定するとともに、光学異性体を含めた、新規プレニルフラボノイド 20 個の化学構造 (Fig. 71) を明らかにすることができた。

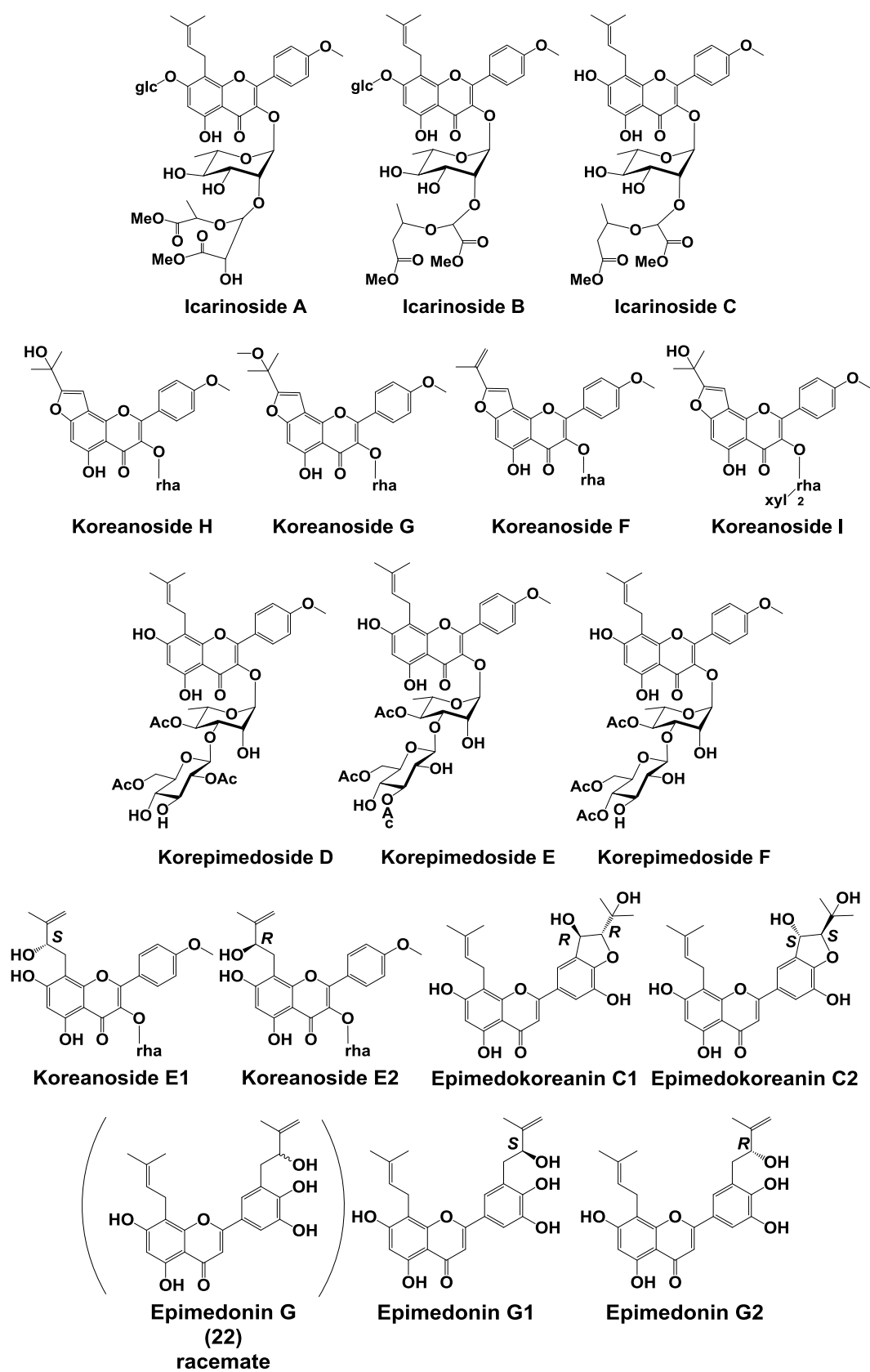


Fig. 71. New prenylflavonoids from *Epimedium Herba*.

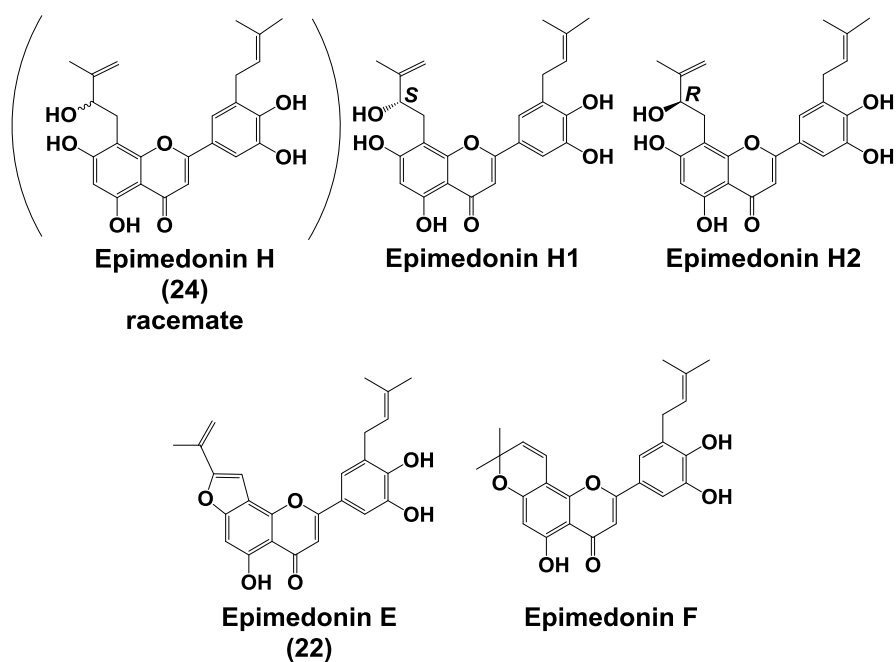


Fig. 71. (Continued)

次に、サンプル量が確保できた 35 個について、抗モノクローナル CML, CMA 抗体を用いた ELISA 法により、CML, CMA 生成阻害活性を測定した。その結果、阻害活性の強い化合物は、配糖体よりもアグリコンであった。また、アグリコンの中でも C 環 3 位に酸素官能基を有するフラボノール骨格より、3 位に酸素官能基が無いフラバン骨格で活性が強いことが判明した。即ち、**EK-B**, epimedonin E (21), G (22), H (24) の 4 種のプレニルフラボノイドに顕著な CML, CMA 生成阻害活性が観察された。

生成阻害活性の強い 4 種の化合物は、共通してカテコール基とプレニル基を有しているため、それらの官能基の重要性を検討した。まず、**EK-B** のフェノール性水酸基をジアゾメタンでメチル化した。その結果、メチル化誘導体は **EK-B** より活性が低下したが、特にフラボノイド骨格 A 環 5 位の水酸基がメチル化された化合物は活性が顕著に低下した。このことから、A 環 5 位の水酸基と C 環 4 位のカルボニル基との水素結合が CML, CMA 生成阻害活性に重要であることが示唆された。また、カテコール基を持つ単純な 3 つの化合物 (gallic acid, pyrogallol, chlorogenic acid) と **EK-B** について CML, CMA 生成阻害活性を比較した。その結果、3 つの化合物ともに **EK-B** より弱い阻害活性を示すのみであった。次に、プレニル基の重要性を検討するために、プロポリス由来の artepillin C, drupanin, baccharin を用いて CML, CMA 生成阻害活性を検討した。しかしながら、どの化合物にも CML, CMA 生成阻害活性は確認できなかった。一方、ラセミ体 epimedonin G (22), H (24) を光学分割し得られた、epimedonin G1 (*S* 体), G2 (*R* 体), 並びに epimedonin H1 (*S* 体), H2 (*R* 体) について、CML, CMA 生成阻害試験を行った。その結果、CML, CMA どちらの阻害活性試験においても活性がどちらかの光学活性

化合物に偏ることなく、ラセミ体と同程度であった。

以上のデータを総合して、CML, CMA 生成阻害活性には、B 環部分にカテコール基、8, 5' 位にプレニル基を有することが必須であり、さらに、5 位の水酸基が水素結合すること、3 位に酸素官能基を持たないことが重要であると判明した。即ち、イカリソウ中の収量 (0.084 %) が多く、CML, CMA 生成阻害活性が最も強い **EK-B** がイカリソウ抽出エキスの活性本体であると判明した(Fig. 72)。

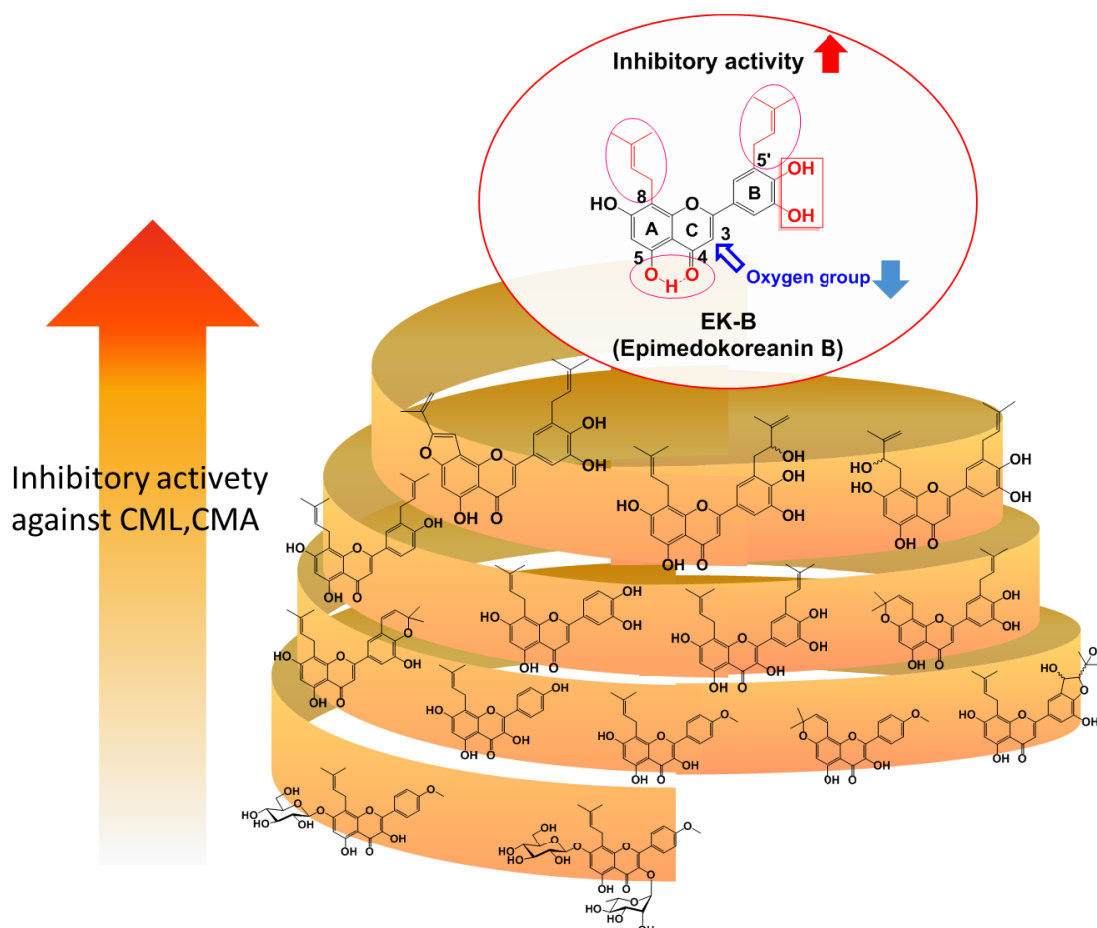


Fig. 72. Characteristic structure of prenylflavonoid having strong inhibitory activity against CML and CMA formation.

以上、本研究により、イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CML, CMA 生成阻害活性の構造活性相関について、いくつかの知見を明らかにすることができた。この情報は、**EK-B** よりさらに強力な CML, CMA 生成阻害剤の開発の指針や、新たな CML, CMA 生成阻害活性を有する天然有機化合物の探索の一助とすることができる。

一方、本研究により、従来、強壯の目的で使用されてきたイカリソウに、抗糖化作用の可能性を示すことが出来た。近年、抗糖化作用を標榜したサプリメントや茶剤、化粧品が市場に出始めているため、同様なイカリソウ含有商品の開発が期待される。また、

イカリソウの主要化合物群であるプレニルフラボノイド配糖体は、経口摂取すると腸内細菌で代謝されてアグリコン (icaritin 等) となり吸収される。今後、本研究を展開する際に必要な動物実験においては、**EK-B** と共に、イカリソウエキスを経口投与することを想定し、プレニルフラボノイド配糖体や対応するアグリコンの活性の検討も必要である。

最後に、AGEs と疾患の関連に関する研究は、急速に発展している。近い将来、著者らの研究対象である AGEs 構造体 CML, CMA の病態との因果関係やその疾患の発症や進展に対する重要性が解明されるとともに、CML, CMA の生成機序の詳細と、**EK-B** に代表されるプレニルフラボノイド類の CML, CMA 生成阻害作用機序が明らかになることが望まれる。そして、イカリソウ由来のプレニルフラボノイド類やイカリソウ製品の重要性と社会的利用価値が高まることを切に願う次第である。

謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜り、本稿の作製に多大なる御教示、御援助を頂きました崇城大学薬学部未病薬学講座付属薬用植物園研究室 池田剛 教授に深く感謝いたします。

本研究を行うに際し、有益なる御指導、御助言を頂きました東海大学農学部バイオサイエンス学科食品生体調節学研究室 永井竜児 准教授に深く感謝いたします。

本研究を行うに際し、終始有益なる御指導、御助言を頂きました崇城大学薬学部生薬学研究室 吉満斉 教授ならびに 宮下裕幸 講師に深く感謝いたします。

本研究に際し、御指導、御助言を頂きました熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学分野 藤原章雄 講師に深く感謝いたします。

本論文作成に当たり、有益な御助言と御校閲を承りました、横溝和美 教授ならびに 衛藤仁 教授に深く感謝いたします。

平成 28 年 3 月 中嶋 圭介

実験の部

分離・構造解析 (第 1、2 章) に関する実験の部

本章で使用した機器、試薬

原料

天然物抽出エキス作成用の生薬	: ウチダ和漢薬 栢本天海堂
イカリソウ (<i>Epimedium Herba</i>)	: ウチダ和漢薬

TLC

Precoated silica gel 60 F ₂₅₄	: Merck
Handy UV Lamp SLUV-6	: アズワン
発色試薬	: 10% H ₂ SO ₄ in MeOH

カラムクロマトグラフィー

Diaion HP-20	: 三菱化学
MCI gel CHP20P	: 三菱化学
Sephadex LH-20	: GE Healthcare Bioscience
μ-Bondapak C ₁₈	: Waters
Silica gel 60 (230-400 mesh)	: Merck

HPLC システム

LC-20AT pump	: 島津製作所
JASCO 830-RI detector	: 日本分光
Sugeai U-620 column heater	: スガイ化学工業
HITACHI L-6200 Intelligent pump	: 日立ハイテクノロジー
HITACHI L-4000 UV detector	: 日立ハイテクノロジー

HPLC カラム

Cosmosil 5C ₁₈ AR-II	: ナカライテスク
Cosmosil π-nap (5 μm, φ 10.0 × 250 mm, respectively)	
Cosmosil 5PYE (5 μm, φ 4.6 × 250 mm)	
X-Bridge Prep C ₁₈ , Sunfire Prep C ₁₈ (5 μm, φ 10.0 × 250 mm, respectively)	: Waters

Triart PFP, and Triart Phenyl : YMC
(5 μm , ϕ 4.6 or 10.0 \times 250 mm, respectively)
Chiralpak IA (5 μm , ϕ 4.6 \times 250 mm) : Daicel

構造解析

HR-ESI-MS

JEOL JMS-T100LP spectrometer : JEOL

^1H and ^{13}C -NMR

JEOL ECA 500 NMR spectrometer : JEOL

^1H -NMR at 500 MHz

^{13}C -NMR at 125 MHz

^1H , ^{13}C -NMR は pyridine- d_5 を溶媒として測定した。Chemical shift は δ 値 (ppm) で表記し、内部標準物質として、pyridine- d_5 の ^1H -NMR (7.20 ppm) と、 ^{13}C -NMR (123.5 ppm) を用いた。また、結合定数 (J) は Hz で表記し、シグナル表記は次の略語を用いた。

s : Singlet, d: Doublet, t : Triplet, dd : Double doublet, m : Multiplet, q : quartet, br : Broad

旋光度

JASCO P-1020 polarimeter : 日本分光

糖部の分析

JASCO OR-2090 Plus Chiral Detector : 日本分光

Shodex RS-Pak DC-613 (ϕ 6.0 \times 150 mm) 昭和電工

絶対立体構造の決定

Dichloromethane : SIGMA

WSC : 和光純薬

TEA : 和光純薬

DMAP : 和光純薬

Naringinase : SIGMA

(-)- α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl Chloride : 東京化成

(+)- α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl Chloride

1-1-2. イカリソウの分離手順 (既知成分)

イカリソウ (Lot number: C1S1504, ウチダ和漢薬) 3.0 kg をメタノールに浸し、超音波抽出を 6 時間 (30 min × 12) × 2 回行い、得られた抽出液を減圧乾固し、485 g の MeOH 抽出物を得た (Chart 6)。得られた MeOH 抽出物を *n*-Hexane と 80% MeOH で分配した。80% MeOH 層を減圧乾固し、得られた 80% MeOH 層 (405 g) を MCI gel CHP20P カラム (φ 4.0 × 30 cm) に付し、H₂O, 50% MeOH, 100% MeOH を移動相として、各 1.5 L カラムに流し、3 つに分画した (Fr. 1~3)。

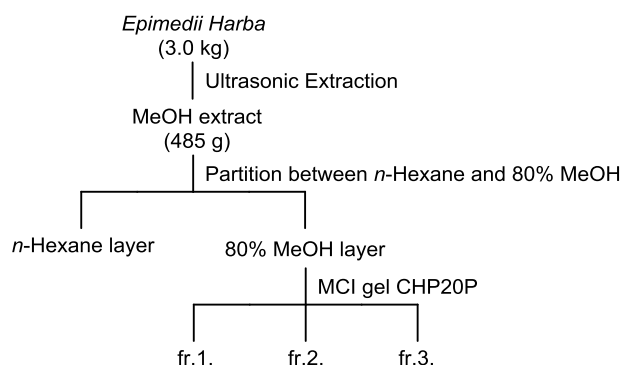


Chart 6.

MCI gel 50% MeOH 溶出分画である Fr. 2 (46.5 g) は、再び MCI gel CHP20P カラム (φ 4.0 × 30 cm) に付した (Chart 7)。移動相として、今回は 20% MeOH~100% MeOH を 10% 間隔のメタノール% でカラムに流し、8 つの分画を得た (fr. 2-1~2-8) (Chart. 7)。Fr.2-6 (5.3 g) を Sephadex LH-20 (φ 2.0 × 100 cm) に付し、移動層として MeOH を用いて分離し、3 つの分画を得た (Fr. 2-6-1~2-6-3)。Fr. 2-6-3 (190 mg) を少量の pyridine に溶解させ、Waters 社製加圧モジュール (以下、中圧カラム) [Waters μ-Bondapak, φ 25 × 200 mm, 60%~90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 mL ずつ] を用いて分離を行い、6 つの分画を得た (Fr. 2-6-3-1~2-6-3-6)。Fr. 2-6-3-5 (10.3 mg), 6 (1.1 mg) は、それぞれ HPLC [Cosmosil 5C₁₈ AR-II (φ 10 × 250 mm, 70% MeOH)] で精製し、**caohuoside C (16: 0.6 mg)**、**epimodoside C (1: 4.5 mg)**、および **cuhuoside (2: 0.5 mg)** を単離した。次に、Fr. 2-7 (1.1 g) について、fr. 2-6 と同様に Sephadex LH-20 (Fr.2-7-1~2-7-4)、中圧カラム [Waters μ-Bondapak, φ 25 × 200 mm, 60%~90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ] (Fr. 2-7-2-1~2-7-2-6) を用いて分離した (Chart 7)。その後、Fr. 2-7-2-2 (34.1 mg) を、シリカゲル SiO₂ [φ 10 × 100 mm, CHCl₃:MeOH:H₂O (以下 C/M/W)= 8:2:0.2 (v/v)]、HPLC [Cosmosil AR-II ODS (φ 10 × 250 mm, 70% MeOH)] を用いて精製し、**epimedin A (3: 1.0 mg)**、**epimedin B (4: 0.5 mg)**、**epimedin C (5: 2.2 mg)** を単離した。また、Fr. 2-7-2-4 (14.5 mg) からは、シリカゲル SiO₂ [φ 10 × 50 mm, C/M/W= 8:2:0.2 (v/v)]、HPLC [Cosmosil 5C₁₈ AR-II (φ 10 × 250 mm, 65% MeOH)] を用いて分離を行い、**epimedin K (7: 2.0 mg)**、

epimedin L (8: 6.2 mg), cahuoside B (9: 14.9 mg), epimedokoreanoside I (10: 12.1 mg) を単離した。

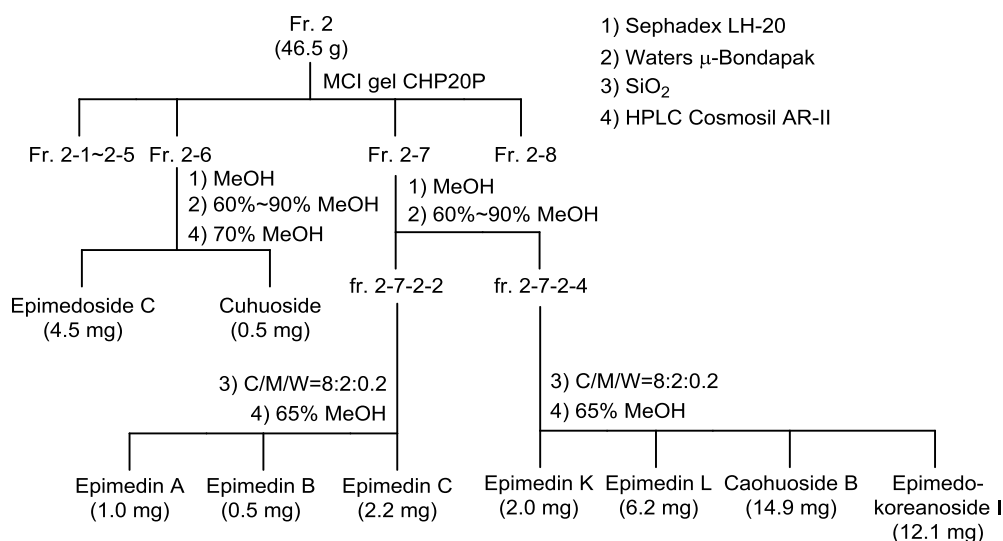


Chart 7.

Fr. 3 (65.0 g) は再度 MCI gel CHP20P カラム [ϕ 4.0×30 cm, 40 % MeOH~ 100% MeOH, 10% 間隔でカラムに 1.5 L ずつ] クロマトグラフィーを行い、8 つの分画を得た (fr. 3-1~3-8) (Chart 8)。その後、Fr. 3-4 (9.0g) の一部 (4.0 g) について、Sephadex LH-20 (ϕ 2.0×100 cm, 100% MeOH) にて分離し、5 つの分画を得た (Fr. 3-4-1~3-4-5)。Fr. 3-4-2 (286 mg) を中圧カラム [Waters μ -Bondapak (ϕ 25×200 mm, 50%~ 80% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ)] を用いて分離を行い、さらに 8 つの分画に分けた (frs. 3-4-2-1~3-4-2-8)。Fr. 3-4-2-2 (55.6 mg) を HPLC [X-Bridge Prep C₁₈ (ϕ 10×250 mm, 65% MeOH(v/v))] を用いて精製し、**epimedokoreanin C (11; 6.3 mg)** を単離することができた。Fr. 3-4-3 (1.5g) の一部 (500 mg) について、中圧カラム [Waters μ -Bondapak, ϕ 25×200 mm, 50%~ 90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ] を用いて分離を行い、6 つの分画に得た (Fr. 3-4-3-1~3-4-3-6)。Fr. 3-4-3-5 (160 mg) は、シリカゲル SiO₂ [ϕ 10 × 100 mm, C/M/W= 9:1:0.1 (v/v)] に通し、9 つの分画にした (Fr. 3-4-3-5-1~3-4-3-5-9)。Fr. 3-4-3-5-7 (31.5 mg) を HPLC [Sunfire Prep C₁₈ (ϕ 10×250 mm, 80% MeOH)] を用いて精製することにより、イカリソウの主成分として報告のある **icariin (12: 28.9 mg)** を単離することができた。また、Fr. 3-4-3-5-9 (71.5 mg) を HPLC [Sunfire Prep C₁₈, (ϕ 10×250 mm, 70% MeOH(v/v))] を用いて精製すると、**sagittatoside A (13: 47.3 mg)**, および **2''-rhamnosylcarisid II (14: 9.8 mg)** を単離することが出来た。Fr. 3-4-4 (660 mg) は Sephadex LH-20 (ϕ 2.0×100 cm, MeOH) に付し、5 つに分画した (Fr. 3-4-4-1~3-4-4-5)。その後、Fr. 3-4-4-2 (285.9 mg) について、中圧カラム [Waters μ -Bondapak, ϕ 25×200 mm, 60%~ 90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ] に通すことで 9 つの分画に分離した (Fr. 3-4-4-2-1~3-4-4-2-9)。Fr. 3-4-4-2-2 (285.9 mg) を HPLC [PFP (ϕ 10×250 mm,

65% MeOH(v/v)) 分取し、**pherodendroside (15: 8.0 mg)** を単離した。隣接する分画である Fr. 3-4-4-2-3 (77.1 mg) はシリカゲル SiO₂ [φ 15×90 mm, C/M/W= 8:2:0.2 (v/v)] に通し、4 つの分画に分離した (Fr. 3-4-4-2-3-1~3-4-4-2-3-4)。次に、Fr. 3-4-4-2-3-2 を HPLC [X-Bridge Prep C₁₈ (φ 10×250 mm, 70% MeOH(v/v))] を用いてピークを分取した結果、**caohuocide C (16: 6.0 mg)** を単離した。隣接する分画 (fr. 3-4-4-2-5 (59.1 mg)) を HPLC [X-Bridge Prep C₁₈ (φ 10 × 250 mm, 70% MeOH(v/v))] を用いて精製したところ、**icariside II (17: 55.1 mg)** を単離することができた。また、fr. 3-4-4-3 (184 mg) について中圧カラム [Waters μ-Bondapak, φ 25×200 mm, 50%~90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ] を用い、9 つの分画を得た (Fr. 3-4-4-2-3-1~3-4-4-2-3-9)。Fr. 3-4-4-3-6 (40.1 mg) をシリカゲル SiO₂ カラム [φ 10×100 mm, C/M/W= 8:2:0.2 (v/v)] で精製したところ、**icarisoside A (18: 27.2 mg)** を単離することができた。

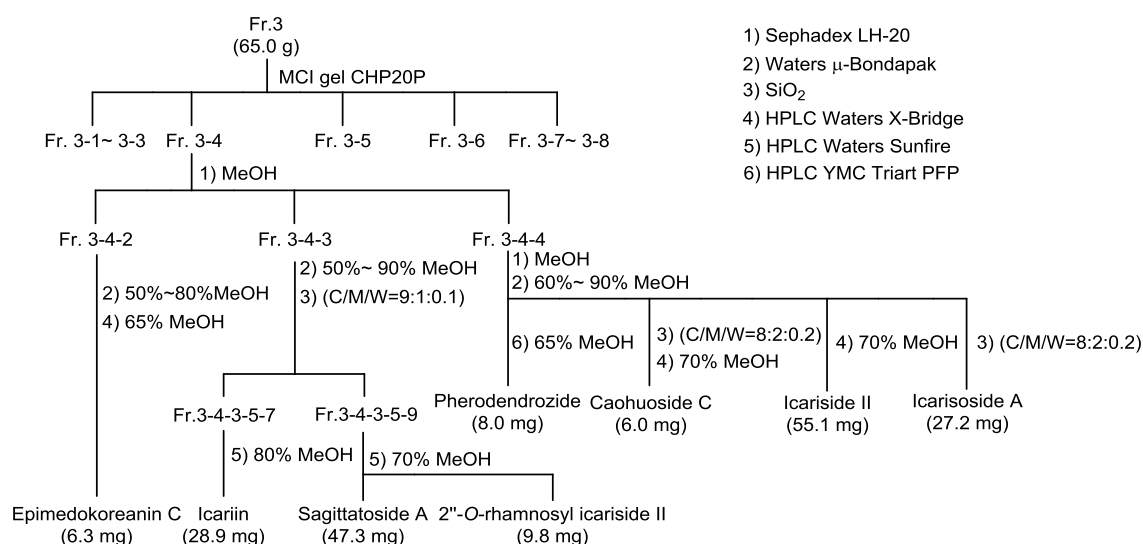


Chart 8.

Fr. 3-5 (10.4 g) については、Sephadex LH-20 カラム (φ 2.0×100 cm, MeOH) に付し、5 つの分画を得た (Fr. 3-5-1~3-5-5) (Chart 9)。その後、fr. 3-5-3 (1.23 g) を中圧カラム [Waters μ-Bondapak, φ 25×200 mm, 60%~90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ] を用い、5 つの分画を得た (fr. 3-5-3-1~3-5-3-5)。Fr. 3-5-3-4 (206.6 mg) をシリカゲル SiO₂ [φ 20×130 mm, C/M/W= 9:1:0.1 (v/v)] で分離して、6 つの分画を得た (fr. 3-5-3-4-1~3-5-3-4-6)。Fr. 3-5-3-4-6 (37.3 mg) は、HPLC [Cosmosil π nap (φ 10 × 250 mm, 80% MeOH(v/v))] を用いて精製した結果、**korepimodoside A (19: 17.1 mg)** を単離した。Fr. 3-5-5 (200 mg) については、シリカゲル SiO₂ [φ 20×130 mm, C/M/W= 8:2:0.2 (v/v)] で7 つに分画した (fr. 3-5-5-1~3-5-5-7)。その fr. 3-5-5-4~3-5-5-6 の3 つの分画は HPLC [Cosmosil C₁₈AR-II (φ 10×250 mm, 70% MeOH(v/v))] を用いた分離により、それぞれの分画から **8-prenyl kaempferol (20: 1.9 mg)**, **icariside I (21: 3.3 mg)**, **8-prenyl luteolin (22:**

4.0 mg) を単離した。

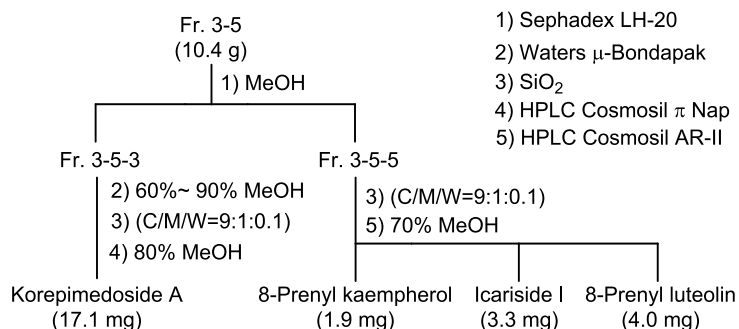


Chart 9.

Fr. 3-6 (12.2 g) については Sephadex LH-20 カラム (ϕ 2.0 \times 100 cm, 100% MeOH) にか
け、5 つの分画を得た (fr. 3-6-1~3-6-5) (Chart 10)。次に、fr. 3-6-4 (188 mg) を中圧カ
ラム [Waters μ -Bondapak, ϕ 25 \times 200 mm, 70%~90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ]
を用いて分離し、8 つの分画を得ることが出来た (fr. 3-6-4-1~3-6-4-8)。Fr. 3-6-4-4
(15.6 mg) を HPLC [Cosmosil C₁₈ AR-II (ϕ 10 \times 250 mm, 80%MeOH(v/v))] を用いて精製
し、**gancaonin B (23: 2.8 mg)** を単離した。Fr. 3-6-4-5 (37.2 mg) を HPLC [Cosmosil C₁₈
AR-II (ϕ 10 \times 250 mm, 85% MeOH (v/v))], 次いで HPLC [YMC PFP (ϕ 4.6 \times 250 mm, 75%
MeOH (v/v))] を用いて分取した結果、**euchrestaflavanon A (24: 2.5 mg)** を単離するこ
とができた。Fr. 3-6-4-6 (23.4 mg) を HPLC [Cosmosil C₁₈ AR-II (ϕ 10 \times 250 mm, 85%
MeOH (v/v))] を用いて分離を行い、**epimedinonin C (25: 5.9 mg)** を単離した。Fr. 3-6-4-7
(8.0 mg) を HPLC [Cosmosil C₁₈ AR-II (ϕ 10 \times 250 mm, 80% MeOH (v/v))] を用いて分離し
た結果、**8,5'-diprenyl apigenin (26: 4.6 mg)** を単離することができた。Fr. 3-6-5 (123 mg)
を中圧カラム[Waters μ -Bondapak, ϕ 25 \times 200 mm, 75%~90% MeOH (v/v), 5% 間隔で 135
ml ずつ] を用いて分離し、5 つの分画を得た (fr. 3-6-5-1~3-6-5-5)。次に、fr. 3-6-5-3
(124 mg) を次に HPLC [Cosmosil C₁₈ AR-II (ϕ 10 \times 250 mm, 85% MeOH (v/v))] を用いて
精製し、**broussonol D (27: 3.7 mg)**, **epimedokoreanin B (28: 33.7 mg)** を単離した。

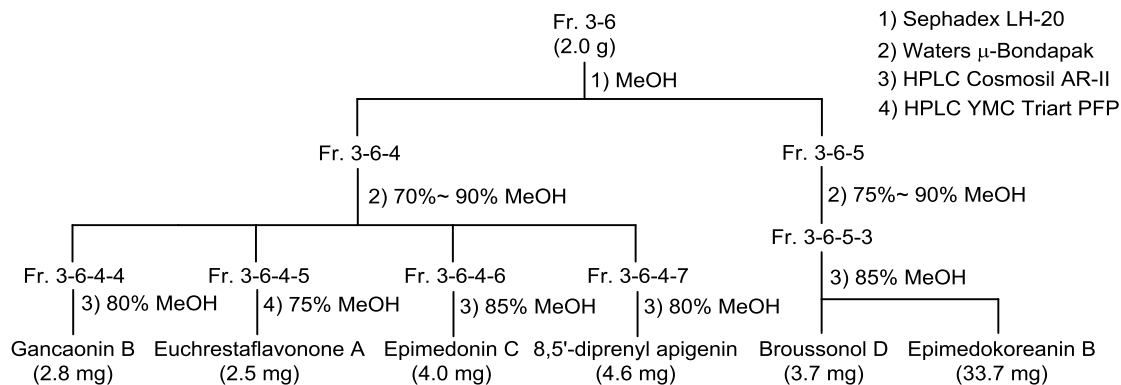


Chart 10.

Fr. 3-7 (15.6 g) については、Sephadex LH-20 カラム (ϕ 2.0×100 cm, MeOH) に付し、5 つの分画を得た (Fr. 3-7-1~3-7-5) (Chart 11)。次に、fr. 3-7-5 (200 mg) を中圧カラム [Waters μ -Bondapak, ϕ 25×200 mm, 80%~100% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ] を用いて分離すると、3 つの分画が得られた (Fr. 3-7-5-1~3-7-5-3)。Fr. 3-7-5-1 (26.9 mg) については、シリカゲル SiO₂ [ϕ 20×130 mm, C/M/W=9:1:0.1 (v/v)] で分離し、さらに、HPLC [Cosmosil C₁₈ AR-II (ϕ 10×250 mm, 80% MeOH (v/v))] を用いて分離し、**4'-O-methyl limonianin (29: 0.9 mg)** を単離することができた。また、fr. 3-7-5-2 (135.6 mg) については、中圧カラム [Waters μ -Bondapak, ϕ 25×200 mm, 80%, 90% MeOH (v/v), 5% 間隔で 135 ml ずつ] を用いて分離し、5 つの分画を得た (Fr. 3-7-5-2-1~3-7-5-2-5)。Fr. 3-7-5-2-1 (42.2 mg) は、さらに HPLC [X-Bridge Prep. C₁₈ (ϕ 10 × 250 mm, 80% MeOH (v/v))] を用いて精製したところ、**limonianin (30: 28.0 mg)** が得られた。

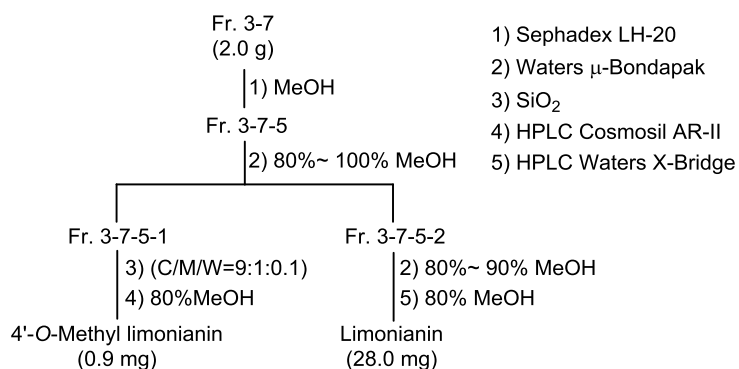


Chart 11.

1-1-3. イカリソウの分離手順 (新規成分)

Fr. 2-7 (1.1 g) は Sephadex LH-20 (MeOH) を用いて 4 つに分画した (fr. 2-7-1~ 2-7-4) (Chart 12)。Fr. 2-7-2 を中圧カラム [Waters μ -Bondapak (ϕ 25×200 mm, 60%~90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ)], シリカゲル SiO₂ [ϕ 10×175 mm, C/M/W= 9:1:0.1 (v/v)], HPLC [Cosmosil C₁₈ AR-II (ϕ 10×250 mm, 60% MeOH)] を用いて分離を行い、**化合物 31** (icarinoside A: 2.0 mg)、**化合物 32** (icarinoside B: 1.3 mg) を単離した。Fr. 2-7-3 を中圧カラム [Waters μ -Bondapak (ϕ 25×200 mm, 50%~100% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ)]、シリカゲル SiO₂ [ϕ 10×150 mm, C/M/W= 8:2:0.2 (v/v)], HPLC [Cosmosil C₁₈ AR-II (ϕ 10×250 mm, 70% MeOH)] を用いて分離を行い、**化合物 33** (koreanoside I: 0.8 mg) を単離した。

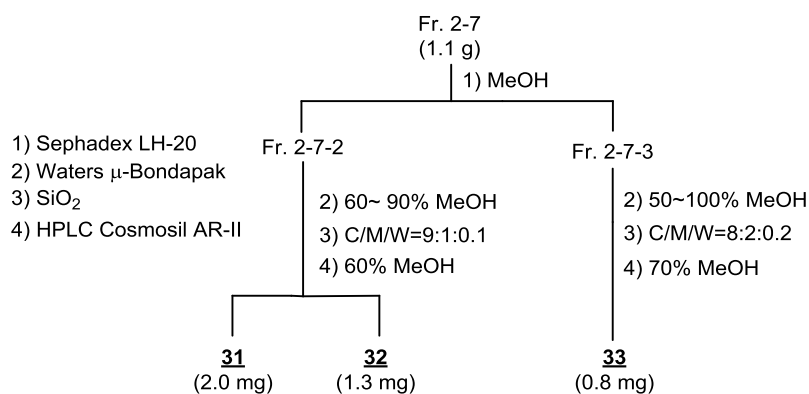


Chart. 12.

Fr. 3-4-3 (1.5 g) については、中圧カラム[Waters μ -Bondapak (ϕ 25×200 mm, 50%~90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135 ml ずつ)] を用いて分離を行い (Frs. 3-4-3-1~ 3-4-3-7)、その後、シリカゲル SiO₂ [ϕ 10×130 mm, C/M/W= 20:1:0~ 8:2:0.2 (v/v)] より分画し、その fr. 3-4-3-3-2 (132 mg) を、HPLC [X-Bridge Prep. C₁₈ (ϕ 10 × 250 mm, 65% MeOH)] で精製した後、再度 HPLC [YMC Triart PFP (ϕ 4.6×250 mm, 60% MeOH)] で分離を行うと、**化合物 34** (koreanoside F: 2.3 mg) を単離することができた。さらに隣接する分画 (Fr. 3-4-3-3-3 (16.3 mg)) を HPLC [Sunfire Prep. C₁₈ (ϕ 10×250 mm, 70% MeOH)] で精製することにより、**化合物 35** (koreanoside E1: 5.1 mg)、**36** (koreanoside E2: 5.5 mg) を単離した。Fr. 3-4-3-4 (199.7 mg) を シリカゲル SiO₂ [ϕ 20×120 mm, C/M/W (9:1:0.1) (v/v)] より分画し、HPLC [X-Bridge Prep. C₁₈ (ϕ 10×250 mm, 60% MeOH)] による分離を行い、**化合物 37** (koreanoside G: 6.2 mg) を単離した。Fr. 3-4-4 (659 mg) は、Sephadex LH-20 に付し、5 つに分画したに (frs. 3-4-4-1~ 3-4-4-5)。Fr. 3-4-4-2 (285 mg) は、その後、中圧のカラム [Waters μ -Bondapak (ϕ 25×200 mm, 50%~80% MeOH (v/v); 10% 間隔で 135 ml ずつ)], HPLC [X-Bridge Prep. C₁₈ (ϕ 10×250 mm, 80% MeOH)] にて精製し、**化合物 38** (koreanoside H: 2.5 mg) を単離した (Chart 13)。

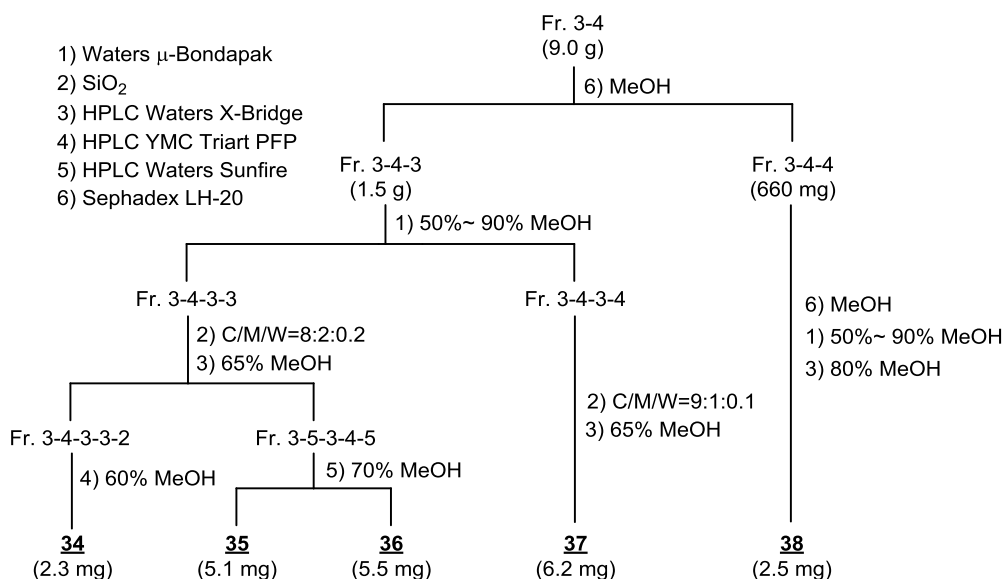


Chart 13.

Fr. 3-5 (10.4 g) については、Sephadex LH-20 (ϕ 2.0 \times 100 cm, MeOH) に付し、MeOH を用いて分離し、5 つの分画を得た (frs. 3-5-1~3-5-5) (Chart 14)。Fr. 3-5-3 (1.23 g) を少量の pyridine に溶解させ、中圧カラム [Waters μ -Bondapak, ϕ 25 \times 200 mm, 60%~ 90% MeOH (v/v), 10% 間隔で 135mL ずつ] を用いて分離を行い、さらに 5 つの分画を得た (frs. 3-5-3-1~3-5-3-5)。次に、fr. 3-5-3-4 (206 mg) は、シリカゲル SiO₂ [ϕ 20 \times 120 mm, C/M/W 9:1:0.1; (v/v)] を用いて 8 つの分画に分離した (frs. 3-5-3-4-1~3-5-3-4-8)。Fr. 3-5-3-4-2 (4.3 mg) は、その後、HPLC [Cosmosil AR-II C₁₈ (ϕ 10 \times 250 mm, 70% MeOH)] を用いて精製し、**化合物 39 (icarinoside C: 3.1 mg)** を得た。Fr. 3-5-3-4-4 (11.5 mg) は、その後、HPLC [Cosmosil AR-II C₁₈ (ϕ 10 \times 250 mm, 70% MeOH)] を用いて分離を行ったところ、**化合物 40 (korepimedoside D: 5.9 mg)** と **化合物 41 (korepimedoside E: 4.5 mg)** を単離することができた。Fr. 3-5-3-4-5 (19.7 mg) は、HPLC [Cosmosil π Nap (ϕ 4.6 \times 250 mm, 60% MeOH)] にかけてところ、3 つの分画に分けることができた (frs. 3-5-3-4-5-1~3-5-3-4-5-3)。Fr.3-5-3-4-5-2 を、HPLC [Triart PFP (ϕ 4.6 \times 250 mm, 70% MeOH)] で精製したところ、**化合物 42 (korepimedoside F: 4.6 mg)** を単離することができた。Fr. 3-5-5 (200 mg) は、シリカゲル SiO₂ [ϕ 10 \times 130 mm, C/M/W= 9:1:0.1 (v/v)] を用いた分離を行い、6 つの分画を得た (frs. 3-5-5-1~3-5-5-6)。Fr. 3-5-5-6 は、HPLC [X-Bridge Prep. C₁₈ (ϕ 10 \times 250 mm, 65% MeOH)] を用いて分離を行った結果、**化合物 43 (epimedonin G: 14.5 mg)**、**44 (epimedonin H: 6.3 mg)** を単離した。

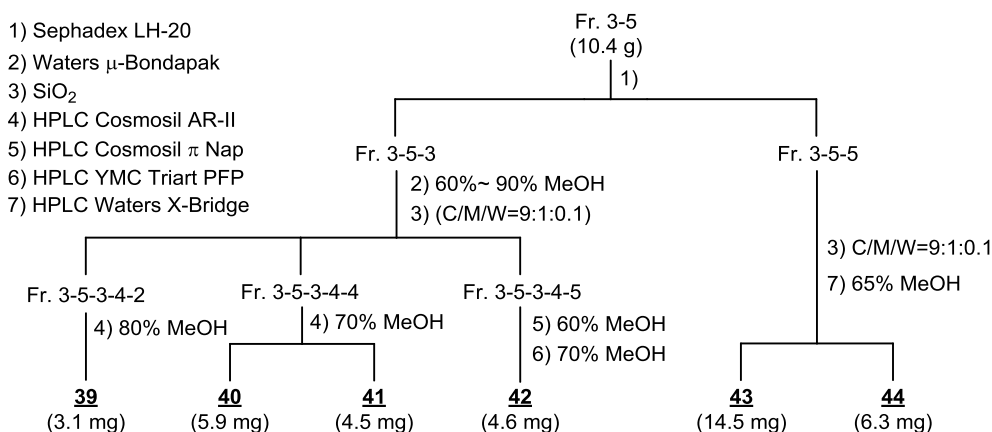


Chart 14.

Fr. 3-6 (12.2 g, eluted by 90% MeOH) は、Sephadex LH-20 (ϕ 2.0×100 cm, MeOH) を用いて分離を行い、6 つの分画に分けた (frs. 3-6-1~3-6-6)。Fr. 3-6-5 は、中圧カラム [Waters μ -Bondapak (ϕ 25×200 mm, 70%~100% MeOH; 10%間隔で 135 ml ずつ)]、シリカゲル SiO₂ [ϕ 8×50 mm, C/M/W (9:1:0.1; v/v)] に順次通し、**化合物 45** (epimedonin E: 4.0mg) を得た (Chart 10)。Fr. 3-7 (2.0 g) は Sephadex LH-20 (ϕ 2.0×100 cm, MeOH)、中圧カラム [Waters μ -Bondapak (ϕ 25×200 mm, 80%~100% MeOH; 10%間隔で 135 ml ずつ)]、シリカゲル SiO₂ [ϕ 12×80 mm, C/M/W (9:1:0.1; v/v)]、HPLC [YMC Triart Phenyl (ϕ 4.6×250 mm, 85% MeOH)] を用いて分離し、**化合物 46** (epimedonin F: 1.9 mg) を単離した (Chart 15)。

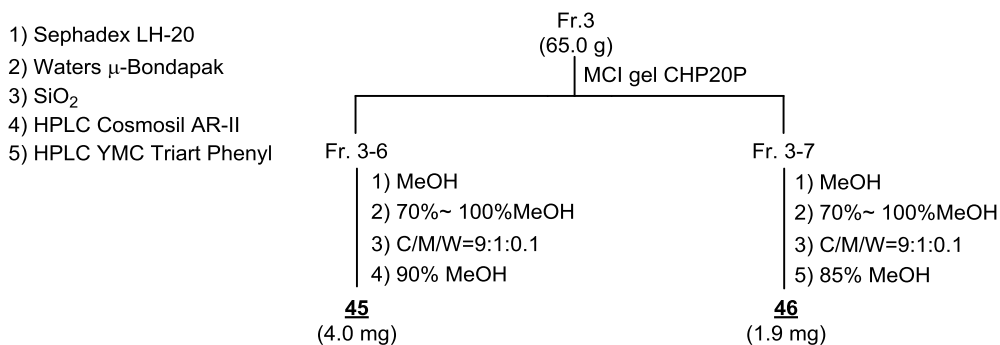


Chart 15.

2-4-2. イカリソウ由来新規化合物の構造解析

2-4-2-1 Icarinoside A (31), B (32), C (39) の構造決定

Icarinoside A (31)

Rf value : 0.49 (solv. CHCl₃:MeOH:H₂O=8:2:0.2), [α]_D -99.2° (*c*=0.20, MeOH), Positive FAB-MS : *m/z* 903 [M+Na]⁺, HR-ESI-MS : *m/z* 903.2896 [M+Na]⁺ (Calcd for C₄₁H₅₂Na₁O₂₁ : 903.2899), ¹H-NMR (in pyridine-*d*₅) [δ _H : 8.11 (2H, d, *J*=8.6, H-2', 6'), 7.22 (1H, s, H-6), 7.18 (2H, d, *J*=9.2, H-3', 5'), 5.50 (1H, t, *J*=7.4, H-12), 3.82,3.68 (1H, m, H-11), 3.76 (3H, s, 4'-OMe), 1.75 (3H, s, H-14), 1.58 (3H, s, H-15), 5.78 (1H, d, *J*=2.9, H-1''), 5.16 (1H, d, *J*=3.5, H-2''), 5.02 (1H, q, *J*=6.9, H-5''), 3.75 (3H, s, H-4''-OMe), 3.74 (3H, s, H-3''-OMe), 1.51 (3H, d, *J*=6.8 H-6''), 5.71 (1H, d, *J*=7.5, glc-1), 4.38 (1H, t, *J*=9.7, glc-3), 4.36 (1H, dd, *J*=7.5, 9.7, glc-2), 4.30 (1H, dd, *J*=9.7, 9.2, glc-4), 4.12 (1H, m, glc-5), 4.49 (1H, br d, *J*=9.7, glc-6), 4.31 (1H, m, glc-6), 6.10 (1H, br s, rha-1), 5.07 (1H, br s, rha-2), 4.55 (1H, dd, *J*=3.5, 9.5, rha-3), 4.17 (1H, t, *J*=9.5, rha-4), 4.00 (1H, m, rha-5), 1.36 (3H, d, *J*=6.3, rha-6)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 157.5 (C-2), 135.0 (C-3), 179.0 (C-4), 160.0 (C-5), 99.1 (C-6), 161.7 (C-7), 109.4 (C-8), 153.8 (C-9), 106.7 (C-10), 22.3 (C-11), 123.6 (C-12), 131.5 (C-13), 25.5 (C-14), 17.9 (C-15), 123.6 (C-1'), 131.5 (C-2'), 114.2 (C-3'), 162.5 (C-4'), 114.2 (C-5'), 130.5 (C-6'), 55.4 (4'-OMe), 105.0 (C-1''), 73.5 (C-2''), 172.0 (C-3''), 173.4 (C-4''), 71.9 (C-5''), 18.8 (C-6''), 51.6 (3''-OMe), 51.9 (4''-OMe), 101.8 (rha-1), 80.0 (rha-2), 71.5 (rha-3), 72.8 (rha-4), 72.1 (rha-5), 17.9 (rha-6), 102.3 (glc-1), 74.6 (glc-2), 78.2 (glc-3), 70.8 (glc-4), 78.7 (glc-5), 61.9 (glc-6)]

Icarinoside B (32)

Rf value : 0.49 (solv. CHCl₃:MeOH:H₂O=8:2:0.2), [α]_D -71.9° (*c*=0.13, MeOH), Positive FAB-MS : *m/z* 903 [M+Na]⁺, HR-ESI-MS : *m/z* 903.2896 [M+Na]⁺ (Calcd for C₄₁H₅₂Na₁O₂₁ : 903.2899), ¹H-NMR (in pyridine-*d*₅) [δ _H : 8.11 (2H, d, *J*= 8.6, H-2', 6'), 7.19 (1H, s, H-6), 7.18 (2H, d, *J*= 9.2, H-3', 5'), 5.51 (1H, t, *J*= 7.4, H-12), 3.82, 3.68 (1H, m, H-11), 3.75 (3H, s, 4'-OMe), 1.75 (3H, s, H-14), 1.58 (3H, s, H-15), 5.94 (1H, s, H-1''), 2.63 (1H, dd, *J*= 6.8, 15.4, H-4''-1), 2.89 (1H, dd, *J*= 6.8, 13.2, H-4''-2), 4.60 (1H, q, *J*= 6.3, 13.2, H-5''), 3.66 (3H, s, H-2''-OMe), 3.64 (3H, s, H-3''-OMe), 1.50 (1H, d, *J*= 6.3 H-6''), 5.70 (1H, d, *J*= 7.5, glc-1), 4.38 (1H, t, *J*= 8.6, glc-3), 4.36 (1H, br d, *J*= 8.6, glc-2), 4.30 (1H, dd, *J*= 8.0, 8.6, glc-4), 4.12 (1H, m, glc-5), 4.49 (1H, br d, *J*= 9.7, glc-6), 4.33 (1H, m, glc-6), 6.11 (1H, br s, rha-1), 5.03 (1H, br s, rha-2), 4.57 (1H, dd, *J*=3.5, 9.2, rha-3), 4.22 (1H, t, *J*= 9.2, rha-4), 4.00 (1H, m, rha-5), 1.36 (3H, d, *J*= 5.7, rha-6)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 157.4 (C-2), 135.0 (C-3), 178.8 (C-4), 159.8 (C-5), 98.9 (C-6), 161.4 (C-7), 109.2 (C-8), 153.5 (C-9), 106.5 (C-10), 22.5 (C-11), 122.8 (C-12), 131.3 (C-13), 25.3 (C-14), 17.7 (C-15), 123.0 (C-1'), 130.8 (C-2'), 114.2 (C-3'), 161.9 (C-4'), 114.2

(C-5'), 130.8 (C-6'), 55.2 (4'-OMe), 100.6 (C-1''), 168.3 (C-2''), 171.3 (C-3''), 41.7 (C-4''), 71.8 (C-5''), 22.0 (C-6''), 51.5 (2''-OMe), 51.2 (3''-OMe), 101.6 (rha-1), 79.4 (rha-2), 71.7 (rha-3), 72.3 (rha-4), 71.4 (rha-5), 17.7 (rha-6), 102.0 (glc-1), 74.3 (glc-2), 77.9 (glc-3), 70.6 (glc-4), 78.4 (glc-5), 61.7 (glc-6)]

Icarinoside C (39)

Rf value : 0.89 (solv. CHCl₃:MeOH:H₂O=8:2:0.2), [α]_D -64.7° (*c*=0.31, MeOH), Positive FAB-MS : *m/z* 702 [M+Na]⁺, HR-ESI-MS : *m/z* 702.2539 [M+Na]⁺ (Calcd for C₃₅H₄₂NaO₁₅ : 702.2524), ¹H-NMR (in pyridine-*d*₅) [δ _H : 8.10 (2H, d, *J*= 8.6, H-2', 6'), 6.88 (1H, s, H-6), 7.16 (2H, d, *J*= 8.6, H-3', 5'), 5.51 (1H, t, *J*= 7.4, H-12), 3.77 (1H, m, H-11), 3.76 (3H, s, 4'-OMe), 1.79 (3H, s, H-14), 1.63 (3H, s, H-15), 5.92 (1H, s, H-1''), 2.59 (1H, dd, *J*= 6.8, 15.4, H-4''-1), 2.86 (1H, dd, *J*= 6.8, 13.2, H-4''-2), 4.62 (1H, q, *J*= 6.3, 13.2, H-5''), 3.62 (3H, s, H-2''-OMe), 3.61 (3H, s, H-3''-OMe), 1.41 (1H, d, *J*= 6.3 H-6''), 6.09 (1H, br s, rha-1), 5.03 (1H, br s, rha-2), 4.57 (1H, dd, *J*=3.4, 9.7, rha-3), 4.20 (1H, t, *J*= 9.7, rha-4), 4.07 (1H, m, rha-5), 1.32 (3H, d, *J*= 6.3, rha-6)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 156.9 (C-2), 135.0 (C-3), 178.7 (C-4), 159.9 (C-5), 98.9 (C-6), 161.8 (C-7), 106.8 (C-8), 154.6 (C-9), 105.0 (C-10), 21.9 (C-11), 123.1 (C-12), 131.5 (C-13), 25.4 (C-14), 17.7 (C-15), 123.0 (C-1'), 130.8 (C-2'), 114.2 (C-3'), 163.0 (C-4'), 114.2 (C-5'), 130.8 (C-6'), 55.2 (4'-OMe), 101.7 (C-1''), 79.6 (C-2''), 71.8 (C-3''), 72.4 (C-4''), 71.5 (C-5''), 17.8 (C-6''), 51.5 (2''-OMe), 51.2 (3''-OMe), 101.7 (rha-1), 79.6 (rha-2), 71.8 (rha-3), 72.4 (rha-4), 71.5 (rha-5), 17.8 (rha-6)]

2-4-2-2 Koreanoside F (34), G (37), H (38), I (33) の構造決定

Korepimedeside I (33)

Rf value: 0.36 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 8:2:0.2), [α]_D -202.3° (*c*= 0.15), Positive ESI-MS: *m/z* 683 [M+Na]⁺; HR-ESI-MS: *m/z* 683.1945 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₃₂H₃₆NaO₁₅: 683.1952), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 8.14 (2H, d, *J*= 6.9, H-2', 6'), 7.18 (1H, s, H-11), 7.17 (2H, d, *J*= 8.6, H-3', 5'), 7.11 (1H, s, H-6), 3.73 (3H, s, 4'-OMe), 1.86 (6H, s, H-14, 15), 6.28 (1H, br s, rha-1), 4.98 (1H, br d, *J*= 3.5, rha-2), 4.61 (1H, dd, *J*= 3.5, 9.2, rha-3), 4.19 (1H, t, *J*= 9.2, rha-4), 4.24 (1H, m, rha-5), 1.37 (3H, d, *J*= 6.3, rha-6), 5.13 (1H, d, *J*= 7.4, xyl-1), 4.02 (1H, dd, *J*= 7.4, 7.5, xyl-2), 4.12 (1H, m, xyl-3), 3.62 (1H, t, *J*= 6.5, xyl-4), 4.21, 4.12 (each 1H, m, xyl-5)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 157.1 (C-2), 133.0 (C-3), 179.5 (C-4), 160.2 (C-5), 94.8 (C-6), 158.9 (C-7), 106.2 (C-8), 149.0 (C-9), 109.7 (C-10), 97.3 (C-11), 165.0 (C-12), 67.1 (C-13), 29.1 (C-14), 29.1 (C-15), 122.9 (C-1'), 131.0 (C-2'), 114.4 (C-3'), 162.1 (C-4'), 114.4 (C-5'), 131.0 (C-6'), 55.3 (4'-OMe), 103.5 (rha-1), 72.5 (rha-2), 71.8 (rha-3), 71.3 (rha-4), 71.9 (rha-5), 17.9 (rha-6), 107.5 (xyl-1), 75.0 (xyl-2), 77.8 (xyl-3), 70.4 (xyl-4), 68.1 (xyl-5)]

Korepimodoside I (33) の加水分解

Korepimodoside I (33, 0.5 mg) を塩酸 (2 M HCl/dioxane= 1:1, 1 mL)に溶解し、10 mL ナシフラスコ内 95°Cで 1.5 時間加水分解を行った。この反応混合物に H₂O (2 mL) を加え、dioxane 留去のためエバポレートを行った。この残渣水溶液を Amberlite MB-3 [ϕ 15mm×40 mm column] にて中和し、得られた水溶液を MCI gel CHP20P [ϕ 15mm×40 mm column] に通し、糖画分 [H₂O (8 mL) で溶出] とアグリコン画分 [MeOH (8 mL) で溶出] を得た。得られた糖画分水溶液を減圧乾固し、残渣を 20 μ L, CH₃CN/H₂O=3 : 1 に溶解し、旋光度計付検出器 (JASCO OR-2090 Plus Chiral Detector) を用いた HPLC [Shodex RS-Pak DC-613 (ϕ 6.0×150 mm, CH₃CN/H₂O=3 : 1), flow rate, 1.0 ml/min, 70 °C] 分析をおこなった。そして、標品の溶出時間と極性 [L-ラムノース: t_R =4.5 min (-), D-キシロース: t_R =5.8 min (+)] を比較することで、korepimodoside I (33) の構成糖はL-ラムノース [t_R =4.5 min (-)] と D-キシロース [t_R =5.8 min (+)] が同定された。

Korepimodoside F (34)

Rf value: 0.67 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 8:2:0.2), [α]_D -203.7° (c = 0.16), Positive ESI-MS: m/z 551 [M+Na]⁺; HR-ESI-MS: m/z 551.1508 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₂₇H₂₈NaO₁₁: 551.1529), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_H 8.17 (2H, d, J = 8.6, H-2', 6'), 7.19 (1H, s, H-11), 7.15 (2H, d, J = 8.6, H-3', 5'), 7.11 (1H, s, H-6), 3.73 (3H, s, 4'-OMe), 1.87 (6H, s, H-14), 6.25 (1H, d, J = 1.8, Rha-1), 5.07 (1H, br d, J = 1.8, Rha-2), 4.59 (1H, dd, J = 3.5, 9.7, Rha-3), 4.28 (1H, t, J = 9.4, Rha-4), 4.05 (1H, m, Rha-5), 1.38 (3H, d, J = 6.3, rha-6)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_C 157.1 (C-2), 133.7 (C-3), 179.5 (C-4), 160.2 (C-5), 94.7 (C-6), 157.9 (C-7), 106.2 (C-8), 149.0 (C-9), 109.7 (C-10), 97.3 (C-11), 165.0 (C-12), 68.1 (C-13), 29.1 (C-14), 29.1 (C-15), 122.9 (C-1'), 130.5 (C-2'), 114.3 (C-3'), 162.0 (C-4'), 114.3 (C-5'), 130.5 (C-6'), 55.2 (4'-OMe), 103.5 (rha-1), 71.4 (rha-2), 71.9 (rha-3), 72.6 (rha-4), 71.8 (rha-5), 17.9 (rha-6)]

Korepimodoside G (37)

Rf value: 0.33 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D -204.1° (c = 0.17), Positive ESI MS: m/z 565 [M+Na]⁺; HR-ESI-MS: m/z 565.1743 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₂₈H₃₀NaO₁₁: 565.1686), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_H 8.22 (2H, d, J = 9.1, H-2', 6'), 7.16 (1H, s, H-11), 7.15 (2H, d, J = 8.6, H-3', 5'), 7.07 (1H, s, H-6), 3.73 (3H, s, 4'-OMe), 3.18 (3H, s, 13-OMe), 1.71 (6H, s, H-14, 15), 6.24 (1H, br s, rha-1), 5.06 (1H, br s, rha-2), 4.57 (1H, dd, J = 3.5, 9.8, rha-3), 4.26 (1H, t, J = 9.8, rha-4), 4.03 (1H, m, rha-5), 1.36 (3H, d, J = 6.3, rha-6)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_C 157.2 (C-2), 133.7 (C-3), 179.4 (C-4), 160.2 (C-5), 94.7 (C-6), 158.9 (C-7), 107.8 (C-8), 158.3 (C-9), 109.1 (C-10), 101.1 (C-11), 159.8 (C-12), 73.1 (C-13), 25.0 (C-14), 25.0 (C-15), 122.9 (C-1'), 131.0 (C-2'), 114.3 (C-3'), 162.0 (C-4'), 114.3 (C-5'), 131.0 (C-6'), 55.2 (4'-OMe), 50.5 (13-OMe), 103.5 (rha-1), 72.5 (rha-2), 71.8 (rha-3), 71.3 (rha-4), 71.9 (rha-5), 17.9 (rha-6)]

Korepimodoside H (38)

Rf value: 0.33 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D -204.1° (*c*= 0.15), Positive ESI-MS: 533 *m/z* [M+Na]⁺; HR-ESI-MS: *m/z* 533.1461 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₂₇H₂₅NaO₁₀: 533.1448), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 8.29 (2H, d, *J*=8.6, H-2', 6'), 7.27 (1H, s, H-11), 7.27 (2H, d, *J*=9.1, H-3', 5'), 6.84 (1H, s, H-6), 5.29, 5.89 (each 1H, s, H-14), 3.82 (3H, s, 4'-OMe), 2.17 (3H, s, H-15), 6.23 (1H, d, *J*=1.8, Rha-1), 5.12 (1H, t, *J*=1.8, Rha-2), 4.63 (1H, dd, *J*=3.4, 9.7, Rha-3), 4.32 (1H, t, *J*=9.4, Rha-4), 4.09 (1H, m, Rha-5), 1.41 (3H, d, *J*=6.3, Rha-6)], ¹³C NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 157.7 (C-2), 136.2 (C-3), 179.7 (C-4), 159.1 (C-5), 94.9 (C-6), 159.1 (C-7), 110.7 (C-8), 156.9 (C-9), 108.1 (C-10), 100.5 (C-11), 156.9 (C-12), 132.7 (C-13), 113.7 (C-14), 19.1 (C-15), 122.9 (C-1'), 131.4 (C-2'), 114.8 (C-3'), 162.0 (C-4'), 114.8 (C-5'), 131.4 (C-6'), 55.7 (4'-OMe), 103.8 (rha-1), 72.1 (rha-2), 72.1 (rha-3), 72.8 (rha-4), 71.7 (rha-5), 18.2 (rha-6)]

2-4-2-3 Korepimodoside D (40), E (41), F (42) の構造決定

Korepimodoside D (40)

Rf value: 0.67 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 8:2:0.2), [α]_D -72.9° (*c*= 0.56), Positive ESI-MS: *m/z* 825 [M+Na]⁺; HR-ESI-MS: *m/z* 825.2606 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₃₉H₄₆NaO₁₈: 825.2582), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 8.16 (2H, d, *J*= 8.6, H-2', 6'), 7.25 (2H, d, *J*= 8.6, H-3', 5'), 6.88 (1H, s, H-6), 5.54 (1H, t, *J*= 7.4, H-12), 4.08, 4.19 (each 1H, m, H-11), 3.79 (3H, s, 4'-OMe), 1.79 (3H, s, H-14), 1.63 (3H, s, H-15), 6.00 (1H, br s, rha-1), 5.71 (1H, t, *J*= 9.5, rha-4), 5.01 (1H, br s, rha-2), 4.59 (1H, dd, *J*= 2.9, 9.2, rha-3), 3.73 (1H, m, rha-5), 2.03 (3H, s, rha-4-Acetyl Methyl), 1.12 (3H, d, *J*= 6.3, rha-6), 5.43 (1H, t, *J*= 9.2, glc-2), 5.09 (1H, d, *J*= 8.0, glc-1), 4.86 (1H, dd, *J*= 1.7, 11.2, glc-6), 4.60 (1H, m, glc-6), 4.18 (1H, m, glc-3), 3.89 (1H, t, *J*= 8.6, glc-4), 3.73 (3H, m, glc-5), 2.18 (3H, s, glc-2-Acetyl Methyl), 2.15 (3H, s, glc 6 Acetyl Methyl)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 157.9 (C-2), 135.2 (C-3), 178.7 (C-4), 160.2 (C-5), 98.9 (C-6), 161.7 (C-7), 105.0 (C-8), 153.9 (C-9), 106.9 (C-10), 21.9 (C-11), 122.8 (C-12), 131.2 (C-13), 25.4 (C-14), 17.9 (C-15), 122.9 (C-1'), 130.8 (C-2'), 114.3 (C-3'), 162.4 (C-4'), 114.3 (C-5'), 130.8 (C-6'), 55.3 (4'-OMe), 102.9 (rha-1), 69.2 (rha-2), 79.2 (rha-3), 71.8 (rha-4), 74.4 (rha-5), 17.2 (rha-6), 20.8, 170.7 (rha-4 Ac), 105.9 (glc-1), 75.3 (glc-2), 73.0 (glc-3), 70.9 (glc-4), 70.9 (glc-5), 64.1 (glc-6), 20.8, 170.5 (glc-2 Ac), 20.8, 170.8 (glc-6 Ac)]

Korepimodoside D (40) の酸加水分解

Korepimodoside D (40, 2.0 mg) を前述した korepimodoside I (33) と同様の方法で酸加水分解し、旋光度計付検出器を用いた HPLC 分析をおこなった。標品の溶出時間と極性 [L-ラムノース: *t*_R=4.5 min (-), D-グルコース: *t*_R=7.4 min (+)] を比較した結果、korepimodoside D (40) の構成糖は L-ラムノース [*t*_R=4.5 min (-)], D-グルコース [*t*_R=7.4 min (+)] と同定

された。

Korepimodoside E (41)

Rf valure: 0.67 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 8:2:0.2), [α]_D -71.9° (*c*=0.23), Positive ESI-MS: *m/z* 825 [M+Na]⁺; HR-ESI-MS: *m/z* 825.2606 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₃₉H₄₆NaO₁₈ : 825.2582), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 8.16 (2H, d, *J* = 8.6, H2', 6'), 7.25 (2H, d, *J* = 8.6, H3', 5'), 6.87 (1H, s, H6), 5.54 (1H, t, *J* = 7.4, H12), 4.08, 4.19 (1H, m, H11), 3.79 (3H, s, 4'-OMe), 1.80 (3H, s, H14), 1.64 (3H, s, H15), 5.71 (1H, t, *J* = 8.6, glc H3), 5.08 (1H, d, *J* = 8.0, glc H1), 4.86 (1H, d, *J* = 12.0, glc H6), 4.67 (1H, dd, *J* = 6.3, 12.0, glc H6'), 6.11 (1H, br s, rha H1), 5.81 (1H, t, *J* = 9.2, rha H4), 5.03 (1H, br s, rha H2), 4.57 (1H, dd, *J* = 3.5, 9.2, rha H3), 4.00 (1H, m, rha H5), 2.15 (3H, s, rha 4 Acetyl Methyl), 1.36 (3H, d, *J* = 5.7, rha H6), 4.11 (1H, t, *J* = 8.6, glc H5), 3.94 (1H, m, glc H4), 3.85 (3H, m, glc H2), 2.15 (3H, s, glc 6 Acetyl Methyl), 2.07 (3H, s, glc 3 Acetyl Methyl)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 157.9 (C-2), 135.2 (C-3), 178.7 (C-4), 160.2 (C-5), 98.9 (C-6), 161.7 (C-7), 105.0 (C-8), 153.9 (C-9), 106.9 (C-10), 21.9 (C-11), 122.8 (C-12), 131.2 (C-13), 17.9 (C-14), 25.3 (C-15), 122.9 (C-1'), 130.8 (C-2'), 144.3 (C-3'), 162.4 (C-4'), 114.3 (C-5'), 130.8 (C-6'), 55.3 (4'-OMe), 102.9 (rha-1), 69.2 (rha-2), 79.2 (rha-3), 71.8 (rha-4), 74.4 (rha-5), 17.2 (rha-6), 170.7, 20.8 (rha-4 Ac), 105.9 (glc-1), 71.4 (glc-2), 78.4 (glc-3), 70.9 (glc-4), 70.9 (glc-5), 64.1 (glc-6), 170.5, 20.8 (glc-3 Ac), 170.8, 20.8 (glc-6 Ac)]

Korepimodoside F (42)

Rf valure: 0.67 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 8:2:0.2), [α]_D -73.1° (*c*=0.22), Positive ESI-MS: *m/z* 825 [M+Na]⁺; HR-ESI-MS: *m/z* 825.2606 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₃₉H₄₆NaO₁₈: 825.2582), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 8.16 (2H, d, *J* = 8.6, H-2', 6'), 7.25 (2H, d, *J* = 8.6, H-3', 5'), 6.88 (1H, s, H-6), 5.54 (1H, t, *J* = 7.4, H-12), 4.19, 4.08 (1H, m, H-11), 3.79 (3H, s, 4'-OMe), 1.79 (3H, s, H-14), 1.63 (3H, s, H-15), 5.31 (1H, t, *J* = 9.2, glc-4), 5.06 (1H, d, *J* = 8.0, glc-1), 4.56 (1H, d, *J* = 12.0, glc-6), 4.35 (1H, dd, *J* = 6.3, 12.0, glc-6'), 4.18 (1H, t, *J* = 8.6, glc-3), 4.04 (1H, m, glc-5), 3.84 (3H, m, glc-2), 2.24 (3H, s, glc-4-Acetyl Methyl), 2.11 (3H, s, glc-6-Acetyl Methyl), 6.09 (1H, br s, rha-1), 5.84 (1H, t, *J* = 9.7, rha-4), 5.03 (1H, br s, rha-2), 4.57 (1H, dd, *J* = 3.4, 9.7, rha-3), 4.07 (1H, m, rha-5), 2.03 (3H, s, rha-4-Acetyl Methyl), 1.32 (3H, d, *J* = 6.3, rha-6)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 157.9 (C-2), 135.2 (C-3), 178.7 (C-4), 160.2 (C-5), 98.9 (C-6), 161.7 (C-7), 105.0 (C-8), 153.9 (C-9), 106.9 (C-10), 21.9 (C-11), 122.8 (C-12), 131.2 (C-13), 17.9 (C-14), 25.3 (C-15), 122.9 (C-1'), 130.8 (C-2'), 144.3 (C-3'), 162.4 (C-4'), 114.3 (C-5'), 130.8 (C-6'), 55.3 (4'-OMe), 102.9 (rha-1), 69.2 (rha-2), 79.2 (rha-3), 71.8 (rha-4), 74.4 (rha-5), 17.2 (rha-6), 170.7, 20.8 (rha-4 Ac), 105.9 (glc-1), 72.8 (glc-2), 73.0 (glc-3), 74.5 (glc-4), 70.9 (glc-5), 64.1 (glc-6), 170.5, 20.8 (glc-4 Ac), 170.8, 20.8 (glc-6 Ac)]

2-4-2-4 Koreanoside E1 (35), E2 (36) の構造決定

Koreanoside E1 (35)

Rf value: 0.56 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 8:2:0.2), [α]_D -92.1° (*c*= 0.27), Positive ESI-MS: *m/z* 529 [M-H]⁻; HR-ESI-MS: *m/z* 529.1726 [M-H]⁻ (Calcd. for C₂₇H₃₀NaO₁₁ : 529.1710), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 8.20 (2H, d, *J* = 8.6, H-2', 6'), 7.07 (1H, d, *J* = 6.9, H-3', 5'), 6.81 (1H, s, H-6), 5.24, 4.89 (each 1H, s, H-14), 4.92 (1H, dd, *J* = 5.7, 12.3, H-12), 3.67 (3H, s, 4'-OMe), 3.43 (2H, m, H-11), 2.00 (3H, s, H-15), 6.16 (1H, br s, rha-1), 5.04 (1H, d, *J* = 2.9, rha-2), 4.56 (1H, dd, *J* = 3.5, 6.3, rha-3), 4.26 (1H, t, *J* = 9.7, rha-4), 4.16 (1H, m, rha-5), 1.39 (3H, d, *J* = 6.3, rha-6)], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 156.5 (C-2), 130.5 (C-3), 178.8 (C-4), 160.3 (C-5), 99.5 (C-6), 164.0 (C-7), 105.1 (C-8), 155.2 (C-9), 105.2 (C-10), 30.3 (C-11), 75.1 (C-12), 104.8 (C-13), 109.9 (C-14), 18.1 (C-15), 122.3 (C-1'), 130.8 (C-2'), 114.2 (C-3'), 161.8 (C-4'), 114.2 (C-5'), 130.8 (C-6'), 55.1 (4'-OMe), 103.6 (rha-1), 71.5 (rha-2), 71.7 (rha-3), 72.0 (rha-4), 72.7 (rha-5), 18.0 (rha-6)]

1) Koreanoside E1 (35) の酵素加水分解

Koreanoside E1 (35) 2.5 mg を DMSO (40 μ L) に溶かし、PBS (pH 6.2, 360 μ L) に混和した。そこに、ナリンギナーゼ (10 mg) を添加し、40°C、120 rpm で 24 時間振とうした。反応液を遠心して上清をとり、沈殿物をシリカゲル SiO₂ [ϕ 10 \times 130 mm, C/M/W= 9:1:0.1 (v/v)] で分離し、koreanoside E1 (35) のアグリコン (35a) を 1.9 mg (収率:73%) 得た。上清は減圧乾固し、得られた糖画分について、旋光度計付検出器 (JASCO OR-2090 Plus Chiral Detector) を用いた HPLC [Shodex RS-Pak DC-613 (ϕ 6.0 \times 150 mm, CH₃CN/H₂O=3 : 1), flow rate, 1.0 ml/min, 70 °C] 分析をおこなった。そして、L-ラムノース (*t_R*=4.5 min (-)) と同定された。

化合物 35a

Rf value: 0.78 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D -60.2° (*c*= 0.19), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ _H 8.12 (2H, d, *J* = 9.1, H-2', 6'), 7.02 (2H, d, *J* = 9.1, H-3', 5'), 6.44 (1H, s, H-6), 5.09, 4.95 (each 1H, br s, H-14a,b), 4.47 (1H, br d, *J* = 8.6, H-12), 3.89 (3H, s, 4'-OMe), 3.34 (1H, br d, *J* = 15.4, H-11a), 3.02 (1H, dd, *J* = 8.6, 15.4, H-11b), 1.87 (3H, s, H-15)]

2) 化合物 35a の MTPA エステルへの誘導

化合物 35a (1.5 mg) をナシフラスコ内に入れ、MeOH (200 μ L) に溶解し、氷内で 2 M の TMS-ジアゾメタンを 800 μ L (67 eq) を添加し、室温に戻し 1 時間反応させた。反応物をシリカゲル SiO₂ [ϕ 10 \times 70 mm, C/M=50:1 (v/v)] で精製し、35b を 1.0 mg (収率:60%)

得た。35b (1.0 mg, 2.34 μ mol) をナシフラスコに入れ窒素置換した後、CH₂Cl₂ (200 μ l) を用いて溶解し、(R)-(-)-MTPA-Cl 試薬を 70 μ l (70 μ mol, 30eq)、DMPA, WSC, TEA をそれぞれ十分量加えて 1 時間反応させた。反応液をシリカゲル SiO₂ [ϕ 10 \times 70 mm, C/M = 50:1 (v/v)]、HPLC [Triart PFP (ϕ 4.6 \times 250 mm, 85% MeOH)] を用いて精製し、35b の(S)-(+)-MTPA エステルである 35b-S を 0.8 mg (収率: 53%) 得た。また、35a (1.6mg) に、35b-S の合成と同様の方法で(S)-(+)-MTPA-Cl 試薬を反応させ、35b-R を 0.5 mg (収率: 38%) 得た。得られた 35b-S、35b-R に改良モッシャー法を適用し、Koreanoside E1 (35) の 12 位の炭素の立体化学は S 体と決定した。

化合物 35b-S

Rf value: 0.78 (solv. CHCl₃: MeOH = 100:1), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ _H 8.02 (2H, d, *J* = 9.1, H-2', 6'), 6.97 (2H, d, *J* = 9.1, H-3', 5'), 6.28 (1H, s, H-6), 5.79 (1H, br d, *J* = 6.3, H-12), 5.11, 5.01 (each 1H, br s, H-14a,b), 4.00, 3.89, 3.88, 3.86 (each 3H, s, 4', 3, 5, 7-OMe), 3.40 (1H, dd, *J* = 10.3, 15.3, H-11a), 3.01 (1H, dd, *J* = 4.0, 15.3, H-11b), 1.89 (3H, s, H-15)]

化合物 35b-R

Rf value: 0.78 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O = 9:1:0.1), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ _H 8.01 (2H, d, *J* = 7.4, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, *J* = 7.4, H-3', 5'), 6.37 (1H, s, H-6), 5.79 (1H, dd, *J* = 4.0, 9.7, H-12), 4.99, 4.96 (each 1H, br s, H-14a,b), 4.02, 3.92, 3.89, 3.88 (each 3H, s, 4', 3, 5, 7-OMe), 3.43 (1H, dd, *J* = 10.3, 13.8, H-11a), 3.03 (1H, dd, *J* = 4.0, 14.3, H-11b), 1.74 (3H, s, H-15)]

Koreanoside E2 (36)

Rf value: 0.56 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O = 8:2:0.2), [α]_D -48.5° (*c* = 0.36), Positive ESI-MS: *m/z* 529 [M-H]⁻; HR-ESI-MS: *m/z* 529.1726 [M-H]⁻ (Calcd. for C₂₇H₃₀NaO₁₁ : 529.1710), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 8.28 (2H, d, *J* = 8.6, H-2', 6'), 7.11 (1H, d, *J* = 6.9, H-3', 5'), 6.84 (1H, s, H-6), 5.21, 4.87 (1H, s, H-14), 4.92 (1H, t, *J* = 4.3, H-12), 3.67 (3H, s, 4'-OMe), 3.44 (2H, m, H-11), 2.00 (3H, s, H-15), 6.25 (1H, br s, rha-1), 5.06 (1H, d, *J* = 1.8, rha-2), 4.55 (1H, dd, *J* = 3.2, 6.0, rha-3), 4.23 (1H, t, *J* = 9.1, rha-4), 3.95 (1H, m, rha-5), 1.30 (3H, d, *J* = 6.3, rha H6)], ¹³C NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 156.8 (C-2), 133.7 (C-3), 179.4 (C-4), 160.3 (C-5), 99.1 (C-6), 164.0 (C-7), 105.1 (C-8), 155.3 (C-9), 105.1 (C-10), 30.3 (C-11), 74.9 (C-12), 105.0 (C-13), 109.9 (C-14), 19.9 (C-15), 122.3 (C-1'), 131.6 (C-2'), 114.2 (C-3'), 161.8 (C-4'), 114.2 (C-5'), 131.6 (C-6'), 55.1 (4'-OMe), 103.1 (rha-1), 71.4 (rha-2), 71.6 (rha-3), 72.0 (rha-4), 72.6 (rha-5), 17.8 (rha-6)]

1) 化合物 36 の酵素加水分解

Koreanoside E2 (36) 2.5 mg を、koreanoside E1 (35) と同様の方法で酵素加水分解し、アグリコン (36a) を 2.0 mg (収率: 75%) 得た。

2) 化合物 36a の MTPA エステルへの誘導

化合物 36a は、化合物 35a と同様の方法でメチル化後、(R-)-MTPA-Cl 試薬を反応させ、36 b-S を 1.5 mg (収率: 47%) 得た。本化合物は前述した koreanoside E1 (35) の誘導体、35 b-R と鏡像異性体の関係にあることから、¹H-NMR のデータが完全に一致した。同様に、既に ¹H-NMR データを持っている化合物 35 b-S は化合物 36 b に (S)-(+)-MTPA-Cl 試薬を用いて調製する 36 b-R と同一の ¹H-NMR スペクトルを示す。よって、化合物 36 b-S と 35 b-S (= 36 b-R) の ¹H-NMR の差をもとに、改良モッシャー法を適用し、koreanoside E2 (36) の 12 位の炭素の立体化学は R と決定した

化合物 36a

Rf value: 0.78 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D -52.0° (*c*= 0.22), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ _H 8.17 (2H, d, *J*= 6.9, H-2', 6'), 7.03 (2H, d, *J*= 6.9, H-3', 5'), 5.04, 4.88 (each 1H, br s, H-14), 4.39 (1H, br d, *J*= 8.6, H-12), 3.90 (3H, s, 4'-OMe), 3.24 (1H, dd, *J*= 2.9, 14.9, H-11a), 3.04 (1H, dd, *J*= 9.1, 14.9, H-11b), 1.85 (3H, s, H-15)]

化合物 36 b-S

Rf value: 0.78 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ _H 8.01 (2H, d, *J*= 7.4, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, *J*= 7.4, H-3', 5'), 6.37 (1H, s, H-6), 5.79 (1H, dd, *J*= 4.0, 9.7, H-12), 4.99, 4.96 (each 1H, br s, H-14a,b), 4.02, 3.92, 3.89, 3.88 (each 3H, s, 4', 3, 5, 7-OMe), 3.43 (1H, dd, *J*= 10.3, 13.8, H-11a), 3.03 (1H, dd, *J*= 4.0, 14.3, H-11b), 1.74 (3H, s, H-15)]

2-4-2-5 Epimedonin G (43), H (44) の構造決定

Epimedonin G (43)

Rf value: 0.45 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D +0.6° (*c*= 0.54), Positive ESI-MS: *m/z* 461 [M+Na]⁺; HR-ESI-MS: *m/z* 461.1585 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₂₅H₂₆O₇: 461.1576), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 7.83 (1H, d, *J*= 1.7, H-2'), 7.73 (1H, d, *J*= 2.3, H-6'), 6.94 (1H, s, H-3), 6.90 (1H, s, H-6), 5.58 (1H, br s, H-12), 3.72 (2H, br d, *J*= 6.3, H-11), 1.88 (3H, s, H-15), 1.63 (3H, s, H-14), 5.25, 4.92 (each 1H, s, H-4''), 4.93 (1H, br s, H-2''), 3.38 (1H, d, *J*= 6.8, H-1''), 2.00 (1H, s, H-5'')], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _C 164.8 (C-2), 103.3 (C-3), 182.7 (C-4), 160.2 (C-5), 98.8 (C-6), 162.5 (C-7), 107.0 (C-8), 155.9 (C-9), 104.5 (C-10), 22.0 (C-11), 123.0 (C-12), 131.3 (C-13), 17.9 (C-14), 25.4 (C-15), 122.1 (C-1'), 112.1 (C-2'), 146.2 (C-3'), 148.4 (C-4'), 129.6 (C-5'), 121.5 (C-6'), 38.0 (C-1''), 75.3 (C-2''), 127.7 (C-3''), 110.4 (C-4''), 17.8 (C-5'')]

Epimedonin H (44)

Rf value: 0.56 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D +0.9° (*c*= 0.38), Negative ESI-MS: *m/z* 437 [M-H]⁻; HR-ESI-MS: *m/z* 437.1631 [M-H]⁻ (Calcd. for C₂₅H₂₅O₇: 437.1600), ¹H-NMR (500

MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_{H} 7.91 (1H, d, $J = 2.3$, H-2'), 7.70 (1H, d, $J = 2.3$, H-6'), 6.86 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, s, H-6), 5.58 (1H, br s, H-12), 3.72 (2H, br d, $J = 6.3$, H-11), 2.04 (3H, s, H-15), 5.14, 4.83 (each 1H, s, H-14), 1.70 (3H, s, H-4''), 1.78 (3H, s, H-5''), 3.73 (2H, d, $J = 7.5$, H-1''), 5.66 (1H, t, $J = 7.5$, H-2'')], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_{C} 164.8 (C-2), 103.1 (C-3), 182.8 (C-4), 160.2 (C-5), 98.8 (C-6), 163.4 (C-7), 105.0 (C-8), 155.9 (C-9), 104.5 (C-10), 30.1 (C-11), 74.9 (C-12), 129.7 (C-13), 110.3 (C-14), 17.6 (C-15), 122.1 (C-1'), 111.6 (C-2'), 146.4 (C-3'), 148.4 (C-4'), 129.6 (C-5'), 119.8 (C-6'), 22.0 (C-1''), 123.0 (C-2''), 132.1 (C-3''), 17.7 (C-4''), 25.4 (C-5'')]

2-4-2-1 Epimedonin E (45), F (46) の構造決定

Epimedonin E (45)

R_f value: 0.56 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O = 9:1:0.1), Negative ESI-MS: m/z 417 [M-H]⁻; HR-ESI-MS: m/z 417.1303 [M-H]⁻ (Calcd. for C₂₅H₂₁O₆: 437.1338), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_{H} 7.99 (1H, d, $J = 2.3$, H-2'), 7.76 (1H, d, $J = 2.3$, H-6'), 7.09 (1H, s, H-3), 7.13 (1H, s, H-6), 6.95 (1H, s, H-11), 5.26, 5.86 (each 1H, s, H-14), 2.09 (3H, s, H-15), 1.79 (3H, s, H-4''), 1.96 (3H, s, H-5''), 3.81 (2H, br d, $J = 7.4$, H-1''), 5.70 (1H, t, $J = 7.4$, H-2'')], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_{C} 165.2 (C-2), 104.7 (C-3), 183.4 (C-4), 159.4 (C-5), 94.7 (C-6), 159.2 (C-7), 110.6 (C-8), 149.0 (C-9), 107.6 (C-10), 100.1 (C-11), 156.6 (C-12), 132.5 (C-13), 113.7 (C-14), 19.2 (C-15), 121.6 (C-1'), 111.9 (C-2'), 147.0 (C-3'), 149.9 (C-4'), 130.2 (C-5'), 120.2 (C-6'), 29.2 (C-1''), 123.5 (C-2''), 132.6 (C-3''), 17.9 (C-4''), 25.9 (C-5'')]

Epimedonin F (46)

R_f value: 0.56 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O = 9:1:0.1), Negative ESI-MS: m/z 417 [M-H]⁻; HR-ESI-MS: m/z 419.1552 [M-H]⁻ (Calcd. for C₂₅H₂₃O₆: 419.1495), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_{H} 7.33 (1H, d, $J = 1.8$, H-2'), 7.29 (1H, d, $J = 1.8$, H-6'), 6.52 (1H, s, H-3), 6.27 (1H, s, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 10.3$, H-11), 5.61 (1H, d, $J = 10.3$, H-12), 1.49 (6H, s, H-14, 15), 1.77 (3H, s, H-4''), 1.82 (3H, s, H-5''), 3.41 (2H, m, H-1''), 5.38 (1H, t, $J = 7.5$, H-2'')], ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_{C} 159.5 (C-2), 103.8 (C-3), 182.8 (C-4), 161.2 (C-5), 100.2 (C-6), 164.6 (C-7), 103.2 (C-8), 152.0 (C-9), 101.5 (C-10), 114.8 (C-11), 127.5 (C-12), 77.1 (C-13), 27.5 (C-14), 28.2 (C-15), 122.0 (C-1'), 110.2 (C-2'), 146.7 (C-3'), 147.0 (C-4'), 128.3 (C-5'), 119.5 (C-6'), 28.0 (C-1''), 121.5 (C-2''), 134.0 (C-3''), 17.8 (C-4''), 25.8 (C-5'')]

2-4-3 ラセミ体の光学分割と絶対立体構造の決定

2-4-3-1 Epimedonin G (43) の光学分割と絶対立体構造の決定

1) Epimedonin G (43) の光学分割

Epimedonin G (43) 6.0 mg を HPLC [Daicel Chiralpak IA (ϕ 4.6 \times 250 mm, Hexane: EtOH=9:1)] で分離し、epimedonin G1 (3.0 mg), G2 (3.0 mg) を得た。

Epimedonin G1 (43-1)

Rf value: 0.45 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D +14.2° (*c*= 0.15, MeOH:DMSO=9:1), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 7.83 (1H, d, *J*= 1.7, H-2'), 7.73 (1H, d, *J*= 2.3, H-6'), 6.94 (1H, s, H-3), 6.90 (1H, s, H-6), 5.58 (1H, br s, H-12), 3.72 (2H, br d, *J*= 6.3, H-11), 1.88 (3H, s, H-15), 1.63 (3H, s, H-14), 5.25, 4.92 (each 1H, s, H-4''), 4.93 (1H, br s, H-2''), 3.38 (1H, d, *J*= 6.8, H-1''), 2.00 (1H, s, H-5'')]]

Epimedonin G2 (43-2)

Rf value: 0.45 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D -12.8° (*c*= 0.22, MeOH:DMSO=9:1), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ _H 7.83 (1H, d, *J*= 1.7, H-2'), 7.73 (1H, d, *J*= 2.3, H-6'), 6.94 (1H, s, H-3), 6.90 (1H, s, H-6), 5.58 (1H, br s, H-12), 3.72 (2H, br d, *J*= 6.3, H-11), 1.88 (3H, s, H-15), 1.63 (3H, s, H-14), 5.25, 4.92 (each 1H, s, H-4''), 4.93 (1H, br s, H-2''), 3.38 (1H, d, *J*= 6.8, H-1''), 2.00 (1H, s, H-5'')]]

2) Epimedonin G1 (43-1), G2 (43-2) の MTPA エステルへの誘導

Epimedonin G1 (43-1, 1.0 mg), G2 (43-2, 1.0mg) を 2-4-2-4 と同様の方法でそれぞれメチル化し、反応物をシリカゲル SiO₂ [ϕ 10 \times 70 mm, C/M = 50:1 (v/v)], HPLC [X-Bridge Prep. C₁₈ (ϕ 10 \times 250 mm, 85% MeOH)] を用いて精製し、化合物 43-1a, 43-2a をそれぞれ 0.8 mg (収率: 73%) 得た。その後、2-4-2-4 と同様の方法で 43-1a, 43-2a の MTPA エステル誘導体を合成し、反応物をシリカゲル SiO₂ [ϕ 10 \times 70 mm, H: A= 1:1 (v/v)], HPLC [Triart PFP (ϕ 4.6 \times 250 mm, 80% MeOH)] を用いて精製し、43-1a の(S)-(+)-MTPA エステルである 43-1a-S を 1.0 mg (収率: 83%)、43-2a の(S)-(+)-MTPA エステルである 43-2a-S を 1.1 mg (収率: 86%) 得た。化合物 43-1 と化合物 43-2 は互いに光学異性体であることから、化合物 43-2-a-S の 2''位と MTPA 試薬の両方の立体を同時に反転させると、化合物 43-1a に(S)-(+)-MTPA-Cl を付加させた化合物 43-1a-R の ¹H-NMR と同じスペクトルになる。従って、改良モッシャー法より、化合物 43-1 の 2''位は S 体、鏡像異性体の関係にある 43-2 の 2''位は R 体と決定した。

化合物 43-1a-S

Rf value: 0.45 (solv. CHCl₃: MeOH = 20:1), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ _H 7.26 (1H, s, H-2'), 7.15 (1H, s, H-6'), 6.52 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, s, H-6), 5.73 (1H, dd, *J*= 4.8, 8.8 Hz, H-2''), 5.26

(1H, br s, H-12), 5.09, 5.00 (each 1H, s, H-4''), 4.02, 3.98, 3.92, 3.90 (each 3H, s, 3', 4', 5, 7-OMe), 3.55 (2H, br d, $J=5.7$, H-11), 3.04 (1H, dd, $J=5.1, 13.7$, H-1''a), 2.96 (1H, dd, $J=9.2, 11.7$, H-1''b), 1.86 (3H, s, H-14), 1.81 (1H, s, H-15) 1.69 (3H, s, H-5''),]

化合物 43-2a-S

Rf value: 0.45 (solv. CHCl₃: MeOH = 20:1), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ_{H} 7.31 (1H, s, H-2'), 7.20 (1H, s, H-6'), 6.57 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, s, H-6), 5.73 (1H, dd, $J=4.6, 9.1$ Hz, H-2''), 5.25 (1H, br s, H-12), 4.98, 4.95 (each 1H, s, H-4''), 4.00, 3.97, 3.93, 3.93 (each 3H, s, 3', 4', 5, 7-OMe), 3.55 (2H, br d, $J=6.3$, H-11), 3.01 (1H, dd, $J=5.1, 13.7$, H-1''a), 3.01 (1H, dd, $J=9.1, 13.7$, H-1''b), 1.79 (3H, s, H-14), 1.75 (1H, s, H-15) 1.67 (3H, s, H-5''),]

2-4-3-2 Epimedonin H (44) の光学分割と絶対立体構造の決定

1) Epimedonin H (44) の光学分割

Epimedonin H (44) 2.0 mg を HPLC [Daicel Chiralpak IA ($\phi 4.6 \times 250$ mm, Hexane: EtOH=95:5)] で分離し、epimedonin H1 (1.0 mg), H2 (1.0 mg) を得た。

Epimedonin H1 (44-1)

Rf value: 0.45 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D +15.5° ($c=0.10$), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_{H} 7.91 (1H, d, $J=2.3$, H-2'), 7.70 (1H, d, $J=2.3$, H-6'), 6.86 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, s, H-6), 5.58 (1H, br s, H-12), 3.72 (2H, br d, $J=6.3$, H-11), 2.04 (3H, s, H-15), 5.14, 4.83 (each 1H, s, H-14), 1.70 (3H, s, H-4''), 1.78 (3H, s, H-5''), 3.73 (2H, d, $J=7.5$, H-1''), 5.66 (1H, t, $J=7.5$, H-2'')]

Epimedonin H2 (44-2)

Rf value: 0.45 (solv. CHCl₃: MeOH: H₂O= 9:1:0.1), [α]_D -13.0° ($c=0.10$), ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) [δ_{H} 7.91 (1H, d, $J=2.3$, H-2'), 7.70 (1H, d, $J=2.3$, H-6'), 6.86 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, s, H-6), 5.58 (1H, br s, H-12), 3.72 (2H, br d, $J=6.3$, H-11), 2.04 (3H, s, H-15), 5.14, 4.83 (each 1H, s, H-14), 1.70 (3H, s, H-4''), 1.78 (3H, s, H-5''), 3.73 (2H, d, $J=7.5$, H-1''), 5.66 (1H, t, $J=7.5$, H-2'')]

2) Epimedonin H1 (44-1), H2 (44-2) の MTPA エステルへの誘導

Epimedonin G1 (44-1, 1.0 mg), G2 (44-2, 1.0 mg) を 2-4-3-1 と同様の方法でそれぞれメチル化し、反応物をシリカゲル SiO₂ [$\phi 10 \times 70$ mm, Hexane: Acetone = 1:1 (v/v)], HPLC [X-Bridge Prep. C₁₈ ($\phi 10 \times 250$ mm, 85% MeOH)] を用いて精製し、化合物 44-1a を 0.7 mg (収率: 62%)、44-2a を 0.7 mg (収率: 72%) 得た。その後、2-4-3-1 と同様の方法で 44-1a, 44-2a の MTPA エステル誘導体を合成し、反応物をシリカゲル SiO₂ [$\phi 10 \times 70$ mm, Hexane: Acetone= 1:1 (v/v)], HPLC [Triart PFP ($\phi 4.6 \times 250$ mm, 80% MeOH)] を用いて精製し、44-1a の(S)-(+)-MTPA エステルである 44-1a-S を 1.0 mg (収率: 80%)、44-2a の

(S)-(+)-MTPA エステルである **44-2a-S** を 1.0 mg (収率: 78%) 得た。化合物 **44-1** と化合物 **44-2** は互いに光学異性体であることから、化合物 **44-2-a-S** の 12 位と MTPA 試薬の両方の立体を同時に反転させると、化合物 **44-1a** に (S)-(+)-MTPA-Cl を付加させた化合物 **44-1a-R** の $^1\text{H-NMR}$ と同じスペクトルになる。従って、改良モッシャー法より、化合物 **44-1** の 12 位は *S* 体、鏡像異性体の関係にある **44-2** の 12 位は *R* 体と決定した。

化合物 **44-1a-S**

Rf value: 0.45 (solv. CHCl_3 : MeOH = 20:1), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) [δ_{H} 7.17 (1H, s, H-2'), 7.15 (1H, s, H-6'), 6.49 (1H, s, H-3), 6.33 (1H, s, H-6), 5.86 (1H, dd, $J = 4.0, 9.3$ Hz, H-12), 5.25 (1H, br s, H-2''), 5.12, 5.00 (each 1H, s, H-14), 4.00, 3.93, 3.89, 3.87 (each 3H, s, 3', 4', 5, 7-OMe), 3.38 (2H, br d, $J = 6.8$, H-1''), 3.45 (1H, dd, $J = 9.3, 14.3$, H-11a), 3.05 (1H, dd, $J = 4.0, 14.3$, H-11b), 1.90 (3H, s, H-4''), 1.74 (1H, s, H-5'') 1.73 (3H, s, H-15),]

化合物 **44-2a-S**

Rf value: 0.45 (solv. CHCl_3 : MeOH = 20:1), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) [δ_{H} 7.16 (1H, s, H-2'), 7.10 (1H, s, H-6'), 6.59 (1H, s, H-3), 6.41 (1H, s, H-6), 5.86 (1H, dd, $J = 4.0, 9.3$ Hz, H-12), 5.22 (1H, br s, H-2''), 4.98, 4.94 (each 1H, s, H-14), 4.02, 3.95, 3.87, 3.77 (each 3H, s, 3', 4', 5, 7-OMe), 3.47 (2H, br d, $J = 6.8$, H-1''), 3.47 (1H, dd, $J = 9.3, 14.3$, H-11a), 3.08 (1H, dd, $J = 4.0, 14.3$, H-11b), 1.90 (3H, s, H-4''), 1.74 (1H, s, H-5'') 1.73 (3H, s, H-15),]

2-4-3-3 Epimedokoreanin C (11) の光学分割と立体構造の決定

1) Epimedokoreanin C (EK-C (11)) の光学分割

EK-C (11) 4.0 mg を HPLC [Daicel Chiralpak IA (ϕ 4.6 \times 250 mm, Hexane: EtOH=9:1)] で分離し、EK-C-1 (2.0 mg), EK-C-2 (2.0 mg) を得た。

Epimedokoreanin C1 (EK-C-1)

Rf value: 0.40 (solv. CHCl_3 : MeOH: $\text{H}_2\text{O} = 9:1:0.1$), $[\alpha]_{\text{D}} -29.1^\circ$ ($c = 0.10$, MeOH:DMSO=9:1), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_5) [δ_{H} 8.00 (1H, s, H-2'), 7.90 (1H, s, H-6'), 6.95 (1H, s, H-3), 6.90 (1H, s, H-6), 6.21 (1H, d, $J = 4.5$, H-1''), 5.60 (1H, t, $J = 6.8, 13.7$, H-12), 5.07 (1H, d, $J = 4.5$, H-2''), 3.77 (3H, d, $J = 6.3$, H-12), 1.96 (3H, s, H-15), 1.67 (3H, s, H-14), 1.63 (3H, s, H-4''), 1.57 (3H, s, H-5'')]

Epimedokoreanin C2 (EK-C-2)

Rf value: 0.40 (solv. CHCl_3 : MeOH: $\text{H}_2\text{O} = 9:1:0.1$), $[\alpha]_{\text{D}} +21.3^\circ$ ($c = 0.10$, MeOH:DMSO=9:1), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Pyridine- d_5) [δ_{H} 8.00 (1H, s, H-2'), 7.90 (1H, s, H-6'), 6.95 (1H, s, H-3), 6.90 (1H, s, H-6), 6.21 (1H, d, $J = 4.5$, H-1''), 5.60 (1H, t, $J = 6.8, 13.7$, H-12), 5.07 (1H, d, $J = 4.5$, H-2''), 3.77 (3H, d, $J = 6.3$, H-12), 1.96 (3H, s, H-15), 1.67 (3H, s, H-14), 1.63 (3H, s, H-4''), 1.57 (3H, s, H-5'')]

2) **EK-C-1**, **EK-C-2** の MTPA エステルへの誘導

EK-C-1 (1.7 mg), **EK-C-2** (2.0 mg) を 2-4-3-2 と同様の方法でそれぞれメチル化し、反応物をシリカゲル SiO_2 [$\phi 10 \times 70$ mm, C/M/W = 9:1:0.1 (v/v)], HPLC [X-Bridge Prep. C_{18} ($\phi 10 \times 250$ mm, 85% MeOH)] を用いて精製し、化合物 **EK-C-1a**, **EK-C-2a** をそれぞれ 1.6 mg (収率: 1a = 84%, 1b = 82%) 得た。その後、2-4-3-2 と同様の方法で **EK-C-1a**, **2a** の MTPA エステル誘導体を合成し、反応物をシリカゲル SiO_2 [$\phi 10 \times 70$ mm, H: A = 1:1 (v/v)], HPLC [Triart PFP ($\phi 4.6 \times 250$ mm, 85% MeOH)] を用いて精製し、**43-1a** の (S)-(+)-MTPA エステルである **EK-C-1a-S** を 1.5 mg (収率: 65%)、**EK-C-2a** の (S)-(+)-MTPA エステルである **EK-C-2a-S** を 1.4 mg (収率: 58%) 得た。化合物 **EK-C-1** と化合物 **EK-C-2** は互いに光学異性体であることから、化合物 **EK-C-2a-S** の 2''位と MTPA 試薬の両方の立体を同時に反転させると、化合物 **EK-C-1a** に (S)-(+)-MTPA-Cl を付加させた化合物 **EK-C-1a-R** の $^1\text{H-NMR}$ と同じスペクトルになる。従って、改良モッシャー法より、化合物 **EK-C-1** の 2''位は R 体、**EK-C-2** の 2''位は S 体と決定した。

化合物 **EK-C-1a-S**

Rf value: 0.40 (solv. CHCl_3 : MeOH = 20:1), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) [δ_{H} 7.42 (1H, br s, H-2'), 7.59 (1H, br s, H-6'), 6.71 (1H, d, $J = 4.0$, H-1''), 6.55 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, s, H-6), 5.23 (1H, br s, H-12), 4.51 (1H, d, $J = 3.4$, H-2''), 4.00, 3.96, 3.94 (each 3H, s, 3', 5, 7-OMe), 3.55 (2H, br s, H-11), 1.77 (3H, s, H-15), 1.65 (1H, s, H-14) 1.35 (3H, s, H-4''), 1.23 (3H, s, H-5'')]]

化合物 **EK-C-2a-S**

Rf value: 0.40 (solv. CHCl_3 : MeOH = 20:1), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) [δ_{H} 7.41 (1H, br s, H-2'), 7.37 (1H, br s, H-6'), 6.71 (1H, d, $J = 4.0$, H-1''), 6.52 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, s, H-6), 5.25 (1H, br s, H-12), 4.65 (1H, d, $J = 3.4$, H-2''), 3.99, 3.95, 3.95 (each 3H, s, 3', 5, 7-OMe), 3.52 (2H, br s, H-11), 1.77 (3H, s, H-15), 1.67 (1H, s, H-14) 1.37 (3H, s, H-4''), 1.33 (3H, s, H-5'')]]

CML, CMA 生成阻害活性試験 (第 3、4 章) に関する実験の部

本章で使用了機器、試薬

超純水システム	: RFD250NB (ADVANYEC)
クリーンベンチ	: MCV-710ATS (SANYO)
遠心機	: TOMY MX-300 (トミー精工)
吸光度測定機	: U-2000 Spectorophotometer (HITACHI)
Microplate washer	: Immuno wash 1575 (バイオ・ラッド)
加温機	: Cassette thermo (コスモバイオ)
インキュベーター	: クールインキュベーター (三菱電機)
シェイカー	: BR-43FL・MR 3 (TAITEC)
マイクロプレートリーダー	: LabSystems Multiskan MS Microplate Reader (Thermo)
PH メーター	: Docu-PH (Sartorius)

[ELISA for detection of CML and CMA]

D-(+)-Ribose 99.5+% (132360250)	: 東京化成
Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibody	: Kirkegaard & Perry Laboratories
OPD (<i>o</i> -Phenylendiamine) tablet	: 和光純薬
H ₂ O ₂	: 和光純薬
Gelatin from porcine skin, Type A (G2500-100G)	: SIGMA
Gelatin hydrolysate Enzymatic	: SIGMA
Mouse monoclonal anti-CMA antibody (3F5)	: 東海大・農
Mouse monoclonal anti-CML antibody (6D12)	: 食品生体調節学研究室 にて作成
cellnest ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプ チド 凍結乾燥体	: 富士フイルム
40% Glyoxal Solution	: 和光純薬
Gallic acid	: 和光純薬
Pyrogallol	: 林純薬
Chlorogenic acid	: 和光純薬
Artepillin C	: 山田養蜂場・ブラジル
Baccharin	: 産プロポリスより単
Drupanin	: 離、構造決定

3-1 イカリソウ由来プレニルフラボノイドの CML, CMA 阻害活性のスクリーニング

以下の (a)~(c) 溶液を 37 °C で 7 日間インキュベーションしたものについて、CML, CMA の生成量を ELISA 法にて測定した。以下に、試薬の調製法および ELISA 法の手順について示す。

- (a) コントロール溶液 : リン酸緩衝液 (CML: 10 mM, CMA: 100 mM) で溶解したゼラチン (2.0 mg/mL) と リボース (30 mM) の混合溶液に、DMSO (10%) を添加した。
- (b) 天然物添加溶液 : (a) と同様のゼラチン・リボース混合溶液に、DMSO (10%) で溶解した天然化合物 100, 10, 1 μ M)、生薬抽出エキスまたは生薬エキス分画溶液 (100, 10 μ g/mL) を添加した。
- (c) ネガティブコントロール溶液 : リン酸緩衝液 (CML: 10 mM, CMA: 100 mM) で溶解したゼラチン (2.0 mg/mL) 溶液に、DMSO (10%) を添加した。
- (d) ポジティブコントロール溶液 : (a) と同様のゼラチン・リボース混合溶液に、DMSO に溶解したピリドキサミン (100 μ M) を添加した。

[試薬の調製]

- Coating solution : 前述の溶液を PBS で 10 μ g protein/mL に希釈した。
- Blocking buffer : 0.5%ゼラチン-PBS 溶液
- Washing beffer : 0.05%Tween20-PBS 溶液
- Substrate buffer : クエン酸 (2.1 g) を蒸留水 (100 mL) に溶解させ、クエン酸水溶液を作製した。次に Na₂HPO₄/12H₂O (7.16 g) を蒸留水に溶解させ、リン酸水素二ナトリウム水溶液を作製した。作製したクエン酸水溶液 (36.4 mM) とリン酸水素二ナトリウム水溶液 (66.7 mM) を混合し、pH を 5 に調製した。
- Detection solution : *o*-Phenyldiamine tablet (一錠) を substrate buffer (10mL) に溶解させ、30% 過酸化水素水溶液 (6 μ L) を加えて作製した。
- Stop solution : 濃 H₂SO₄ (30 mL) を蒸留水 (500 mL) に加え 2M H₂SO₄ を作製した。

- 一次抗体 : washing buffer を用いて Mouse monoclonal anti-CML antibody (6D12) を 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に、また、Mouse monoclonal anti-CMA antibody (3F5) を 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して用いた。
- 二次抗体 : Hoseradish peroxidase (HRP) –conjugated anti-mouse IgG antibody を washing buffer で 5000 倍希釈して用いた。

[ELISA の手順]

- 1) 96 well イムノプレートに、Coating solution を入れ (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)、室温で 2 時間静置してコーティングした。
- 2) Washing buffer で 3 回洗浄し、Blocking buffer を入れ (200 $\mu\text{L}/\text{well}$)、室温で 1 時間静置してブロッキングした。
- 3) Washing buffer で 2 回洗浄した後、一次抗体を入れ (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)、室温で 1 時間静置した。
- 4) Washing buffer で 3 回洗浄した後、二次抗体を入れ (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)、室温で 1 時間静置した。
- 5) Washing buffer で 3 回洗浄した後、Detection solution を入れ (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)、3~8 分間発色させた。その後、Stop solution を入れ (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)、ELISA plate reader を用いて 492 nm の吸光度を測定した。

3-2 グリオキサールによる CML, CMA 生成に対する阻害活性の検討

以下の (a) ~ (c) 溶液を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 3 日間インキュベーションしたのについて、CML, CMA の生成量を 3-1 と同様の ELISA 法にて測定した。

- (a) コントロール溶液 : リン酸緩衝液 (CML: 10mM, CMA: 100 mM) で溶解したゼラチン (2 mg/mL) とグリオキサール(5 mM) の混合溶液に、DMSO (10%) を添加した。
- (b) 天然物添加溶液 : (a) と同様のゼラチン・グリオキサール混合溶液に、DMSO (10%) で溶解した EK-B (100, 10, 1 μM) を添加した。
- (c) ネガティブコントロール溶液 : リン酸緩衝液 (CML: 10mM, CMA: 100 mM) で溶解したゼラチン (2 mg/mL) 溶液に、DMSO (10%) を添加した。
- (d) ポジティブコントロール溶液 : (a) と同様のゼラチン・グリオキサール混合溶液に、DMSO に溶解した PM、または Luteolin (100, 10, 1 μM) を添加した。

3-3 I型コラーゲンに生成する CML, CMA の阻害活性の検討

以下の (a)~(d) 溶液を 37 °C で 7 日間インキュベーションしたもののについて、CMA の生成量を 3-1 と同様の ELISA 法にて測定した。

- (e) コントロール溶液 : I型コラーゲン (1.5 mg/mL) 溶液と、リボースをリン酸緩衝液 (CML: 10mM, CMA: 100 mM) にて溶解して調製したリボース溶液 (30 mM) を混合し、そこに DMSO (10%) を添加した。
- (f) 天然物添加溶液 : (a) と同様のコラーゲン・リボース混合溶液に、DMSO (10%) にて溶解した天然由来化合物 (30 μ M) を添加した。
- (g) ネガティブコントロール溶液 : コラーゲン (1.5 mg/mL) とリン酸緩衝液 (CML: 10mM, CMA: 100 mM) の混合溶液に、DMSO (10%) を添加した。
- (h) ポジティブコントロール溶液 : (a) と同様のコラーゲン・リボース混合溶液に、DMSO に溶解した Luteolin (100, 10, 1 μ M) を添加した。

4-1 カテコール構造の重要性の検討

(1) EK-B のメチル化

EK-B (8) 20 mg (47.4 μ mol) をナシフラスコ内に入れ、MeOH (200 μ L) に溶解し、氷内で 2.0 M の TMS-ジアゾメタンを 500 μ L (5 eq) 添加し、室温に戻し 1 時間反応させた。反応物をシリカゲル SiO₂ [ϕ 10 \times 70 mm, H:A=3:1 (v/v)], HPLC [Triart PFP (ϕ 4.6 \times 250 mm, 100 % MeOH)] で精製し、化合物 **47**, **48**, **49** をそれぞれ 1.6 mg (収率: 11%), 2.6 mg (収率:25%), 5.5 mg (収率:19%) 得た。得られた化合物を DMSO に溶解し、活性用サンプルとした。

化合物 47 (Dimetoxy EK-B)

R_f value: 0.60 (solv. H:A= 2:1), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ _H 7.41 (1H, s, H-2'), 7.34 (1H, s, H-6'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.42 (1H, s, H-6), 5.27 (1H, t, *J*= 6.4, H-12), 4.90 (1H, t, *J*= 6.3, H-2''), 3.94, 3.90 (each 3H, s, 4', 7-OMe), 3.52 (2H, d, *J*= 8.3, H-11), 4.92 (2H, d, *J*= 7.5, H-1''), 1.84 (3H, s, H-15), 1.80 (3H, s, H-5''), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.69 (3H, s, H-14)]

化合物 48 (Trimethoxy EK-B)

Rf value: 0.75 (solv. H:A= 2:1), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ_{H} 7.41 (1H, s, H-2'), 7.34 (1H, s, H-6'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.42 (1H, s, H-6), 5.27 (1H, t, *J*= 6.4, H-12), 4.90 (1H, t, *J*= 6.3, H-2''), 3.94, 3.91, 3.90 (each 3H, s, 3', 4', 7-OMe), 3.52 (2H, d, *J*= 8.3, H-11), 4.92 (2H, d, *J*= 7.5, H-1''), 1.84 (3H, s, H-15), 1.80 (3H, s, H-5''), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.69 (3H, s, H-14)]

化合物 49 (Tetramethoxy EK-B)

Rf value: 0.20 (solv. H:A= 2:1), ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) [δ_{H} 7.41 (1H, s, H-2'), 7.34 (1H, s, H-6'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.42 (1H, s, H-6), 5.27 (1H, t, *J*= 6.4, H-12), 4.90 (1H, t, *J*= 6.3, H-2''), 3.94, 3.91, 3.90, 3.90 (each 3H, s, 3', 4', 5, 7-OMe), 3.52 (2H, d, *J*= 8.3, H-11), 4.92 (2H, d, *J*= 7.5, H-1''), 1.84 (3H, s, H-15), 1.80 (3H, s, H-5''), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.69 (3H, s, H-14)]

引用文献

1. Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, Ouchi Y. Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Pathol.* 1998;51:515-519.
2. Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomuta H, Ikeda K, Horiuchi S. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia.* 1997;40:764-769.
3. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, Pischon N, Trackman PC, Gerstenfeld L, Graves DT. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone.* 2007;40:345-353.
4. Morita K, Urabe K, Moroi Y, Koga T, Nagai R, Horiuchi S, Furue M. Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound Repair Regen.* 2005;13:93-101.
5. Iijima K, Murata M, Takahara H, Irie S, Fujimoto D. Identification of N^{ω} -carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochem J.* 2000;347 Pt 1:23-27.
6. Odani H, Iijima K, Nakata M, Miyata S, Kusunoki H, Yasuda Y, Hiki Y, Irie S, Maeda K, Fujimoto D. Identification of N^{ω} -carboxymethylarginine, a new advanced glycation endproduct in serum proteins of diabetic patients: possibility of a new marker of aging and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285:1232-1236.
7. Sell DR, Monnier VM. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J. Clin. Invest.* 1990;85:380-384.
8. Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int.* 1998;53:416-422.
9. G. Hein, R. Wiegand, G. Lehmann, G. Stein, S. Franke. Advanced glycation end-products pentosidine and N^{ϵ} -carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology.* 2003; 42: 1242–1246.
10. Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: A possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 2010; 21: 195-214.
11. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW, Thorpe SR. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes.* 2002;51:2826-2832.
12. Onorato JM, Jenkins AJ, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of

- pyridoxamine. *J. Biol. Chem.* 2000;275:21177-21184.
13. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* 2002;61:939-950.
 14. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I, Brownlee M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.* 2003;9:294-299.
 15. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley PJ. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes.* 2003;52:2110-2120.
 16. Miyata T, Ueda Y, Asahi K, Izuhara Y, Inagi R, Saito A, Van Ypersele De Strihou C, Kurokawa K. Mechanism of the inhibitory effect of OPB-9195 [(+/-)-2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-yl] cetanilide on advanced glycation end product and advanced lipoxidation end product formation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000;11:1719-1725.
 17. Tsuchida K, Makita Z, Yamagishi S, Atsumi T, Miyoshi H, Obara S, Ishida M, Ishikawa S, Yasumura K, Koike T. Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia.* 1999;42:579-588.
 18. Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, Kawata T, Koike T. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes.* 1997;46:895-899.
 19. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986;232:1629-1632.
 20. Thorsten PD, Nathan LA, David DA, Robert JB, John MB, Michael WS, Suzanne RT, John WB. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* 2002;61:939-950.
 21. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich MB, John W, Thorpe SR. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes.* 2002;51:2826-2832.
 22. Requena JR, Vidal P, Cabezas-Cerrato J. Aminoguanidine inhibits protein browning without extensive Amadori carbonyl blocking. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1993;19:23-30.
 23. Bousova I, Bacilkova E, Dobrijevic S, Drsata J. Glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal, effect of hydroxycitric and uric acid. *Mol Cell Biochem.* 2009;331:215-223.
 24. Wu CH, Yen GC. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of

- advanced glycation endproducts. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:3167-3173.
25. Cervantes-Laurean D, Schramm DD, Jacobson EL, Halaweish I, Bruckner GG, Boissonneault GA. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *J. Nutr. Biochem.* 2006;17:531-540.
 26. Lunceford N, Gugliucci A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia.* 2005;76:419-427.
 27. Sakai A, Nakayama M, Numata M, Takesawa S, Nakamoto M. Sodium sulfite and N-acetylcysteine: new additives to dialysate for inhibiting formation of glucose degradation products and advanced glycation end-products. *Adv. Perit. Dial.* 2001;17:66-70.
 28. Motomura K, Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Takeya M, Nohara T, Nagai R, Ikeda T. Astragalosides isolated from the root of astragalus radix inhibit the formation of advanced glycation end products. *J. Agric. Food. Chem.* 2009;57:7666-7672.
 29. Matsumoto K, Fujiwara Y, Nagai R, Yoshida M. Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in human bladder with specific monoclonal antibody. *Int. J. Urol.* 2009;16:402-405; discussion 405-406.
 30. Guo ZJ, Niu HX, Hou FF, Zhang L, Fu N, Nagai R, Lu X, Chen BH, Shan YX, Tian JW, Nagaraj RH, Xie D, Zhang X. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1699-1712.
 31. Nagai R, Fujiwara Y, Mera K, Motomura K, Iwao Y, Tsurushima K, Nagai M, Takeo K, Yoshitomi M, Otagiri M, Ikeda T. Usefulness of antibodies for evaluating the biological significance of AGEs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1126:38-41.
 32. Mera K, Fujiwara Y, Otagiri M, Sakata N, Nagai R. Immunological detection of N^ω-(Carboxymethyl) arginine by a specific antibody. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1126:155-157.
 33. Fujiwara Y, Kiyota N, Motomura K, Mera K, Takeya M, Ikeda T, Nagai R. Some natural compounds enhance N^ε-(carboxymethyl) lysine formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008;1126:152-154.
 34. Fujiwara Y, Yoshitomi M, Mera K, Nagai M, Takeya M, Ikeda T, Nagai R. Some natural products extracts inhibit the formation of N^ω-(carboxymethyl) arginine. *Royal Society of Chemistry.* 2010;322:206-210.
 35. Sell DR, Monnier VM. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J. Clin. Invest.* 1990;85:380-384.
 36. Morita K, Urabe K, Moroi Y, Koga T, Nagai R, Horiuchi S, Furue M. Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound Repair Regen.* 2005;13:93-101
 37. Hao Wu, Eric JL, Linda LL. Chemical and pharmacological investigations of *Epimedium* species: a survey: *Progress in Drug Research.* 2003;60.

38. National Administration Bureau in Traditional Chinese Medicines (China): *Zhong HuaBen Cao* (Chinese Herbs), 1st ed. *China Scientific and Technique Press*. 1998;3:308-315.
39. Satake Y, Ohwi J, Kitamura S, Watari S, Tominari T, *Wild flowers of JAPAN*. 1982;2:89-90.
40. Chinese Materia Medica Grand Dictionary 3 rd ed. Shougakukan, 1998;46-48.
41. Akai S, Nakazawa K. Untersuchungen uber die Bestandteile von Epimedium Arten. (III. Mitteil.) Uber die ehemisohe Konstitution eines neuen Flavonglykosides von *Epimedium macranthum* Morr. et Decne. (III. Mitten.) Synthese von Anhydroicaritol und Anhydroicaritin trimethyl ather. 1935;236-599.
42. Moriyasul M, Koyama R, Kawanishil K, Okugawaz H. Comparison of Flavonoidal Constituents in Different *Epimedium* Species. *The Japanese Society of Pharmacognosy*. 2010;64(1):1-6.
43. J Guo, F Li, Q Wu, Q Gong, Y Lu, J Shi. Protective effects of icariin on brain dysfunction induced by lipopolysaccharide in rats: *Phytomedicine*, 2010, 17, 950–955.
44. H.P. Ma, X.N. Ma, B.F. Ge, P. Zhen, J. Zhou, Y.H. Gao, C. J. Xian, K.M. Chen. Icariin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in osteoblasts and preserves their osteogenic differentiation potential *in vitro*. *Cell Prolif*. 2014;47:527–539.
45. Zhang J, Wang YB, Ma CG, Liu T, Li WR, Gong YQ, Xin ZC, Icarisid II, a PDE5 inhibitor from *Epimedium wanshanense*, increases cellular cGMP by enhancing NOS in diabetic ED rats corpus cavernosum tissue. *Andrologia*. 2012;44:87–93.
46. Cui L, Sun E, Wang J, Jia X, Wu F. Preparation of epimedins A, B, C from *Epimedium brevicornum* Maxim using middle pressure preparative system combined auto purification system: *Nanjing Zhongyiyao Daxue Xuebao*, 2013, 29-1, 60-62.
47. Sun P, Chen Y, Sshimizu N, Takeda T. Studies on the constituents of *Epimedium koreanum*. III. *Chem. Pharm. Bull*. 1998;46-(2):355-358.
48. Zhang HF, Yan LH, Zhang QW, Wang ZM, Flavonoids from leaves of *Epimedium pubescens*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. 2013;38-12:1942-1946.
49. Mizuo M, Sakura H, Noriyo S, Munekazu I, Toshiyuki T, LZ. D, Flavonol Glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochemistry*. 1988;27:3641.
50. Yoshiteru O, Maki O, Hiroshi H, Validity of Oriental medicines. Part 122. Epimedins A, B and C, flavonoid glycosides of *Epimedium koreanum* herbs. *Heterocycles*. 1987;26(4):935-938.
51. Mizuo M, Sakakibara N, Norio S, Flavonol glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochemistry*. 1988;26:3641.
52. Hai-Yu Z, Li F, Lei Z, Jian H, Bao-Rong W, De-An G. 8-3,3-Dimethylallyl)-Substituted Glycosides from the Aerial Parts of *Epimedium koreanum*. *Helevetica Chimica*.

2007;90:2186-2194.

53. Quan X, Dujuan X, Zhaogang H, Jianjun L, Xinqun W, Xiu W, Shangquan L. Preparation of icariside II from icariin by enzymatic hydrolysis method. *Fitoterapia*. 2010;81:437-442.
54. Mizuo M, Sakura H, Noriyo S, Munekazu I, Toshiyuki T, Liu Xin-Shun, Min Zhi-Da. Flavonoid glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochemistry*. 1988;27:3641-3643.
55. Zhang H, Zhao T, Yin W, Wu M. An NMR Study on 3''-Carbonyl-2''-B-L-quinovosyl Icariside II. *Chinese journal of magnetic resonance*, 2007;24;1;2-7.
56. Wen-Kui L, Pei-Gen X, Jing-Qi P. Complete Assainment of ¹H and ¹³C NMR Spectra of Icariside A and Epimedeside C. *Magn. Reson. Chem.*, 1998;36:303-304.
57. Li WK, Zhang RY, Xiao PG. Epimedokoreanin B and Epimedokoreanin C from the aerial parts of *Epimedium koreanum* Nakai. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1994;29(11):835-839.
58. Xiaowu D, Yongjian F, Lingjun Y, Yongzhou H. Synthesis of Four Natural Prenylflavonoids and Their Estrogen-like Activities. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2007;340:372-376.
59. Nakahara K, Roy MK, Ono H, Maeda I, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M, Trakoontivakorn G. Prenylated flavanones isolated from flowers of *Azadirachta indica* (the neem tree) as antimutagenic constituents against heterocyclic amines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(22):6456-6460.
60. Qinghao J, Chul L, Jin WL, Eung TY, Dongho L, Sang BH, Jin TH, Youngsoo K, Mi KL, Bang YH. 2-Phenoxychromones and Prenylflavonoids from *Epimedium koreanum* and Their Inhibitory Effects on LPS-Induced Nitric Oxide and Interleukin-1 β Production. *J. Nat. Prod.* 2014;77 (7):1724–1728.
61. Zhang PC, Wang S, Wu Y, Chen RY, Yu DQ. Five new diprenylated flavonols from the leaves of *Broussonetia kazinoki*. *J. Nat. Prod.* 2001;64(9):1206-9.
62. Bacher M, Brader G, Greger H, Hofer O. Complete ¹H and ¹³C NMR data assignment of new constituents from *Severinia buxifolia*. *Magn. Reson. Chem.* 2010;48(1):83-88.
63. Ohtani I, Kusumi T, Kashman Y, Kakisawa H. High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *Journal of the American Chemical Society*. 1991;113(11):4092-4096.
64. Turibio K, Joseph N, Patrice K, Anne-Claire M, Muhammad S, Bonaventure T, Marie-Aleth L. Triprenylated Flavonoids from *Dorstenia psilurus* and Their γ -Glucosidase Inhibition Properties. *J. Nat. Prod.* 2008;71:2068–2072.
65. Yoshikawa M, Murakami T, Inaduki M, Hirano K, Yamahara J, Matsuda H. Absolute Stereostructures of Betavulgarosides III and IV, Inhibitors of Glucose Absorption, from the Roots of *Beta vulgaris* L. (Sugar Beet). *Chem. Pharm. Bull.* 1997;45:3: 561-563.
66. Yao C, Zhang X, Zhang W, Shen Y, Xu Y. New flavonol glycosides from *Epimedium*

sagittatum. *Natural product research and development*. 2004;16:2:101-103.

67. Takeuchi M, Jun-ichi T, Sho-ichi Y. Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: a novel therapeutic strategy. *Current drug targets*. 2010;11:1468-1482.