博土論文

バンコマイシン耐性腸球菌に対する抗菌性を有する

甘草のフェノール性成分の研究

平成 26 年 9 月

額尓敦巴雅尓

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博土後期課程創薬生命科学専攻

要 旨1
総論の部4
緒 言5
第1章 東北甘草とそのエキスの VRE に対する抗菌作用
1-1. 甘草とその成分に関する従来の研究
1-2. 各種の修治製品を含む甘草エキスの VRE に対する抗菌作用
第2章 甘草のフェノール性成分の単離・同定,構造決定11
2-1. 甘草からの成分の分画・精製, 同定, 構造決定11
2-1-1. 甘草の酢酸エチルエキスからの 5,7-di-O-methylluteone,
demethylglycyrol 等の単離11
2-1-2. 甘草の酢酸エチルエキスからの 4'-O-methylglycybenzofuran,
neoglycybenzofuran 等の単離13
2-2. 既知フェノール性成分の同定14
2-3. 新規化合物の構造決定
2-3-1. 5,7-Di-O-methylluteone (11)の構造
2-3-2. Demethylglycyrol (35) の構造
2-3-3. 4'-O-Methylglycybenzofuran (39)の構造
2-3-4. Neoglycybenzofuran (40) の構造
2-4. イソフラボンの 1H NMR スペクトル上の 2 位のシグナルのケミカルシ
フトと構造上の特徴48
第3章 甘草から単離したフェノール性成分の VRE に対する抗菌効果の検討

3-1. VRE 菌株の性質	
3-2. 甘草のフェノール性成分の VRE に対する抗菌効果	:の検討55
第4章 主要なフェノール性成分の HPLC による一斉分析	の条件の検討 66
4-1. 甘草抽出物中のフェノール性成分の HPLC 分析条	牛の検討67
4-2. 甘草の主要なフェノール性成分の LC-MS 分析	
4-3. 主要なフェノール性成分の定量分析	
4-4. 甘草のフェノール性成分の構造上の特徴	
総 括	
実験の部	
謝 辞	
参考文献	
参考論文と学会発表	
化合物リスト	

要 旨

中国の中医学,日本の漢方医学のような伝統医学で使用される生薬や,アジ ア各地域の少数民族が民族薬として使用している植物は,その使用経験から低 毒性の医薬品開発のリード化合物を探索する資源として重要と考えられる.本 研究では,最も繁用される代表的な生薬の一つである甘草の成分について抗菌 作用物質の開発の観点から研究を進め,以下に示すように新規化合物の構造, 甘草の各種フェノール性成分のバンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin-resistant Enterococci, VRE) に対する抗菌作用,甘草の主要なフェノール性成分の一斉分 析条件の確立など,新たな知見を得ることができた.

(1) フェノール性成分の単離同定,構造決定

東北甘草の酢酸エチル抽出物中のフェノール性成分について精製・単離を行い,以下に示す 1~43 の化合物を単離した.得られた化合物のうち,新規化合物については構造決定を行い,既知化合物については各種スペクトルデータに基づいて同定した.

既知化合物としては計 39 種の化合物を単離した. それぞれについて ¹H NMR スペクトル等によって構造を検討し、フラボノール類 3 種 [kaempferol-3-0methyl ether (1), kaempferol (2), isolicoflavonol (3)], フラバノン類 3 種 [6"-Oacetylliquiritin (4), liquiritin (5), liquiritigenin (6)], カルコン類 1種 [isoliquiritin (7)], イソフラボン類 12種 [allolicoisoflavone B (8), formononetin (9), semilicoisoflavone B (10), glycyrrhiza-isofavone B (12), glycyrrhizaisofavone (13), 7-O-methylluteone (14), 8- $(\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)-wighteone (15), gancaonin G (16), isoangustone A (17), 6,8diprenylorobol (18), glicoricone (19), licoricone (20)], イソフラバン類 3 種 [glyasperin D (21), glyasperin C (24), licoricidin (25)], イソフラバノン類 3 種 [glyasperin J (22), glyasperin J trimethylether (23), $3'-(\gamma,\gamma-\text{dimethylallyl})-\text{kievitone}$ (26)], 3-アリルクマリン類 6 種 [licopyranocoumarin (27), isoglycycoumarin (28), licoarylcoumarin (29), glycyrin (30), glycycoumarin (31), 3-(p-hydroxyphenyl)-7methoxycoumarin (43)], プテロカルパン類 1 種 [demethylhomopterocarpan (32)], クメスタン類2種 [glycyrol (33), isoglycyrol (34)], 2-アリルベンゾフラン類3種 [gancaonin I (36), licocoumarone (37), glycybenzofuran (38)], ベンジルフェニルケト ン類1種[licoriphenone (41)], 単純フェノールカルボン酸類1種 [p-hydroxybenzoic

acid (42)]と同定した.

さらに、新規化合物として 4 種の化合物を単離した. それらのうち化合物 11 については、高分解能 FAB-MS, UV, ¹H NMR, ¹³C NMR, および各種 2D-NMR (¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC) スペクトルデータに基づいて、5,7-di-O-methylluteone (11) の構造を明らかにした (Fig. 1). また、化合物 35 についても各種スペクトル データに基づいて demethylglycyrol (35) の構造を推定し、さらに別途、化合物 35 および glycyrol (30) のメチル化を行って同一の化合物 44 および 45 を得たこと により、その構造の裏付けを得た (Fig. 1). 残る 2 種の新規化合物 39 および 40 についても、NOESY スペクトルを含む各種 NMR スペクトルデータに基づいて 2-アリル-3-メチルベンゾフラン構造を推定し、化合物 39, 40、および glycybenzofuran (38) のメチル化によっていずれからも同一の glycybenzofuran tetrarmethyl ether (46) を得たことに基づいて、4'-O-methylglycybenzofuran (39) お よび neoglycybenzofuran (40) の構造を確立した (Fig. 1).



Fig. 1. Structures of new phenolics isolated from licorice.

(2) 甘草から単離したフェノール性化合物の VRE に対する抗菌作用の検討 こうして甘草から得た各化合物について, 2 種の VRE 菌株に対する抗菌作用 の評価の結果, 3-アリルクマリンの licoarylcoumarin (29), glycycoumarin (31), 2-ア リルベンゾフランの gancaonin I (36), および新規化合物 neoglycybenzofuran (40) について 2 種の菌種に対する最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) がいずれも 16 μ g/mL またはそれ以下で, 今研究で対象とした化合物の中 は強い抗菌作用を示すことが明らかになった. また, イソフラボンの 8-(γ , γ dimethylallyl)-wighteone (15) および isoangustone A (17), イソフラバンの glyasperin C (24), licoricidin (25), および 3'-(γ , γ -dimethylallyl)-kievitone (26) などに 同様の活性を認めた, これらのうち両菌株に対して最も強い作用をしたのは licoricidin (25) であた. その他のフェノール性成分についてもこれらよりやや弱 いが, その多くに VRE に対する抗菌作用が見られることが明らかになった.

(3) 甘草のフェノール性成分の HPLC による一斉分析条件の検討

甘草の酢酸エチル抽出物中におけるフェノール性成分の寄与を明確にし,抗 菌作用物質開発の素材としての甘草についての評価を実施するために,主要な フェノール性成分の HPLC による一斉分析の条件を検討し,そのプロファイル を作成した. HPLC 上の各ピークの同定には,保持時間とともに,ダイオードア レイ検出器 (photo-diode-array detector, DAD) による UV スペクトルをも使用し た. さらに LC-MS を使用した分析をも実施した.

これらのうち明瞭なピークを示した 8 種の化合物については, 酢酸エチル抽 出物中の定量をも行った. その結果, VRE に対して比較的抗菌作用の強かった glycyrin (30), glycycoumarin (31), gancaonin I (36) などが比較的多量含まれており, これらの化合物の甘草が示す抗菌作用への寄与が重要であることが認められた.

3

総論の部

緒言

中国、日本、東南アジア諸国など東アジア各国では、漢方などの伝統医学で使用されてきている植物とともに、各地域や少数民族のあいだで民族薬として使用されているような植物資源が多数ある. 甘草は中医学や日本の漢方医学で広く利用されてきた生薬で. グリチルリチンおよび関連トリテルペン配糖体とともに、様々なタイプのフェノール性成分を含むことが見出されてきている. 甘草の抽出物や成分の生物活性について多くのグループにより研究が進められており、癌、動脈硬化、胃潰瘍、肝炎など、様々なヒトの疾患に対する作用について研究されている.¹⁴⁾ 甘草のフェノール性成分の抗菌作用については、*Helicobacter pyroli, Streptococcus mutans* など多くの細菌に対する抗菌活性も報告されている,⁵⁻⁷⁾本学生薬学教室においても、決明子や大黄、山椒などの生薬成分とともに、甘草のフェノール性成分にもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) に対する強い抗菌効果が見られること,⁸⁻¹⁰⁾ 中でも甘草のlicoricidinのように、オキサシリン耐性に対する強い抑制効果を示すものがあることをも明らかにしている.¹⁰⁾

多剤耐性菌による感染症は、世界的に非常に深刻な問題となっている.¹¹⁾ 各種 の薬剤耐性菌のうち、バンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin-resistant *Enterococci*; VRE)は、MRSA とともに院内感染の深刻な脅威となりつつある. VRE は多くの抗生物質に対する耐性を有しており、linezolid や quinupristin/dalfopristin 合剤などが使用されるが、linezolid は骨髄抑制作用があり、quinupristin/dalfopristin 合剤にも肝障害や汎血球減少症などの副作用が知られ、また耐 性の出現も危惧されることから、VRE に対する低毒性の新たな抗菌作用物質の 開発が求められている.^{12,13)}

実際,本研究で使用した VRE 菌株の *Enterococcus faecalis* FN-1 および *E. faecium* NCTC12201 は多くの抗生物質に耐性を有することが明らかになっており,中でもバンコマイシンに対しては MIC が 100 μ g/mL 以上で高度に耐性化しており,さらに erythromycin など他の抗生物質に対しても耐性を有することが示されている.また,既存の抗菌薬のうち,quinupristin/dalfopristin 合剤は,*E. faecalis* に対して抗菌活性を示さないことも知られている.

上述したように、甘草のフェノール性成分については多くの細菌に対する抗 菌作用が認められていることから、本研究においては VRE に対する抗菌性物質 開発の素材としての甘草に着目し、そのフェノール性成分について VRE に対す る抗菌効果を検討し、新規物質を含めた抗菌薬のリード化合物となる物質の開 発を進めることとした.その結果、第2章に述べるように、甘草から新規化合物 を含めてフェノール性化合物 43 種を得て、それらの同定、構造解明を行うこと ができた.また、第3章で述べるように、それらのうち数種の化合物については VRE に対し比較的強い抗菌作用を示すことが明らかになった.

甘草には多くのフェノール性成分が含まれるが、それぞれの成分のエキス中 での相対的な抗菌作用への関与や、それらをもとにした生薬としての甘草の抗 菌素材としての評価についても、検討を進める必要がある.そこで、主要なフェ ノール性成分については、第4章で示すように高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による生薬中の一斉分析の条件をも検討し、これを確立することがで きた.

第1章 東北甘草とそのエキスの VRE に対する抗菌作用

1-1. 甘草とその成分に関する従来の研究

甘草はマメ科 Glycyrrhiza属の植物に由来し,特に中国北部を中心に分布する G. uralensis,中国西部から中央アジア,さらに南ヨーロッパの乾燥地に至るまで 広く分布するG. glabra,および中国西北部を中心に分布するG. inflataの3種類が 商業的に利用される.これらのうち,前二者が,日本薬局方収載の甘草の基原植 物とされている.薬用部位は根およびストロン(根茎)であり,古くからアジア および欧州で生薬として利用されてきた.わが国においても最も多くの漢方処 方に配剤されて漢方医学で広く利用され,また医薬品原料,化粧品,天然の甘味 料として需要がある.中でもG. uralensisを基原とする東北甘草は日本国内でも 広く漢方で利用されており,入手が容易で,その基原植物も明確であることか ら,本研究ではこの東北甘草を使用した.

これまでに、甘草の成分については、グリチルリチンおよび関連の構造のト リテルペノイドサポニンに関する研究が進められてきたほか、フラバノン配糖 体の liquiritin (5)、カルコン配糖体の isoliquitirin (7)、およびそれらのアグリコン などが知られてきた。グリチルリチンについてはその抗炎症作用や、副作用と しての偽アルドステロン症への関与など多くの研究があるが、他方で、甘草の 抗潰瘍作用画分として FM100 が知られ、¹⁴⁾ これへのフラボノイドの寄与が示さ れたことから、フラボノイドについても研究も進められ、さらに基原植物によ って、特徴的なフラボノイドが含まれることも明らかにされてきた.¹⁵⁾

さらにフラボノイドや関連のフェノール性成分の解明が進められるにつれ, その作用についても, 抗酸化作用, 種々の酵素に対する阻害作用, ヒト免疫不全 ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) に対する抗ウイルス作用なども 明らかにされてきた.¹⁶⁾

抗菌作用についても多くの検討が進められ、それらのうち、 γ,γ -dimethylallyl 基 (プレニル基) およびフェノール性水酸基を有するフェノール性成分については、 多剤耐性を有するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対し、8-(γ,γ dimethyallyl)-wighteone (15) および3'-(γ,γ -dimethylallyl)-kievitone (26) が強い抗菌 作用を示すこと、さらに licoricidin (25) が β -ラクタム剤のオキサシリン耐性を低 濃度で抑制することを明らかにされてきた.⁹⁻¹¹⁾ そこで、甘草のフェノール性成分について精査を進め、これについて VRE に 対する作用物質の検討を進めることとした.

1-2. 各種の修治製品を含む甘草エキスの VRE に対する抗菌作用

甘草については、周囲の皮部を除いた皮去り甘草や、加熱処理を経た炙甘草、 蜂蜜の存在下に加熱した蜜炙甘草など、種々の修治処理が行われた各種甘草が 使用される.特に中国においては、各種の生薬について多くの修治操作が施さ れたものが使用される.

一方, 甘草の成分の抽出にあたっては, 使用される溶媒の極性によって, その 抽出成分に著しい差があり, 非配糖体型のフェノール性成分は酢酸エチルによ って効率よく抽出できること, これに対し, 酢酸エチル抽出後にメタノール抽 出を行うと, サポニン類および配糖体型のフェノール性成分が抽出されること が, これまでの生薬学教室での検討により明らかになっている.

そこで、修治および未修治の甘草について、酢酸エチル、次いでメタノールで 抽出して各エキスを得、これらについて VRE に対する作用を検討した.修治製 品については、市販の炙甘草および蜜炙甘草とともに、東北甘草を実験の部に 示すようにして自家加熱処理したものについても検討を行った.

その結果, Table 1 に示すように, 未修治の甘草の酢酸エチル抽出物について, VRE に対して最も強い抗菌作用が見られたので, これについてさらに成分の検討を進めることとした.

	MIC (µg/mL)		
Sample	Enterococcus faecium	Enterococcus facalis	
	FN-1	NCTC12201	
EtOAc extract from untreated	16	20	
Tohoku licorice	10	52	
EtOAc extract from heat treated	>128	128	
licorice (commercial product)	>120	128	
EtOAc extract from Licorice			
after heat treatment with	64	32	
honey (commercial product)			
EtOAc extract from Tohoku			
licorice after heat treatment (in	64	128	
house material)			
MeOH extract from untreated	<u>\128</u>	>128	
Tohoku licorice	>128		
MeOH extract from heat treated	100	128	
licorice (commercial product)	120	128	
MeOH extract fromLicorice			
after heat treatment with	>128	128	
honey (commercial product)			
MeOH extract from Tohoku			
licorice after heat treatment (in	128	128	
house material)			

Table 1. Antibacterial effects of various licorice extracts on Enterococci shown by their minimum inhibitory concentrations (μ g/mL).

第2章 甘草のフェノール性成分の単離・同定,構造決定

2-1. 甘草からの成分の分画・精製,同定,構造決定

2-1-1. 甘草の酢酸エチルエキスからの 5,7-di-*O*-methylluteone, demethylglycyrol 等の単離

甘草には、数多くのフラボノイド関連のフェノール性化合物が含まれている. このようなフェノール性化合物については、通常、天然物の分離に広く利用さ れるシリカゲルカラム等によるクロマトグラフィーでは、ゲルへの吸着による 損失が起こりやすく、またシリカゲル中に微量含まれる金属の存在下に化学変 化を受けやすいため、効率的な分離に障害になる.向流分配 (counter-current distribution, CCD) は、担体を使用せず、液-液間の分配のみによって化合物間の 分離を行う方法であるため、担体との接触によるサンプルの吸着や化学変化が 起こらないので、試料の損失なしにフェノール性成分の分離をおこなうことが できる.CCD は、遠心向流分配クロマトや液滴向流分配クロマトを使用した場合 に可能となる高度な分離は期待できないが、比較的多量の試料に対して極性の 大小で化合物群を大きく分離する場合に用いれば効率的な方法である.そこで まず、東北甘草から得た酢酸エチルエキスについて、CCD により分画を行い、さ らに逆相系クロマトグラフィー等を組み合わせることによって、フェノール性 成分の精製を行うこととした.

すなわち, 東北甘草について *n*-ヘキサンで脱脂後, 酢酸エチルによって得た 抽出物について Fig. 2 に示すように CCD で分画し, さらにシリカゲル, ODS-gel および MCI-gel CHP-20P によるカラムクロマトを行って分画精製し, 最終的に HPLC 分取によって, 計 27 種の化合物を単離した. 単離した化合物については 各種スペクトルデータによって同定, 構造解明を行った. Tohoku licorice

Extracted with *n*-hexane → *n*-Hexane extract
 Extracted with ethyl acetate

EtOAc extract

⁻ Countercurrent distribution (CHCl₃–MeOH–H₂O, 7:13:8)

 Column chromatography (Silica gel, ODS-gel, MCI gel) and preparative HPLC

Phenolic compounds

kaempferol-3-*O*-methylether (1),¹⁷⁾ kaempferol (2),¹⁸⁾ isolicoflavonol (3),¹⁹⁾ 6"-*O*-acetylliquiritin (4),²⁰⁾ liquiritin (5),²¹⁾ liquiritigenin (6),²²⁾ isoliquiritin (7),¹⁵⁾ allolicoisoflavone B (8),²²⁾ formononetin (9),²³⁾ semilicoisoflavone B (10),²⁴⁾ 5,7-di-*O*-methylluteone (11), gancaonin G (16),²⁵⁾ 6,8-diprenylorobol (18),²⁶⁾ glicoricone (19),²⁷⁾ licoricone (20),²⁸⁾ glyasperin D (21),²⁹⁾ isoglycycoumarin (28),³⁰⁾ licoarylcoumarin (29)¹⁶⁾, glycyrin (30),³¹⁾ glycycoumarin (31),³²⁾ glycyrol (33),³¹⁾ isoglycyrol (34),³³⁾ demethylglycyrol (35), gancaonin I (36),³⁴⁾ licocoumarone (37),³¹⁾ *p*-hydroxybenzoic acid (42),³⁵⁾ 3-(*p*-hydroxyphenyl)-7-methoxycoumarin (43).³⁶⁾

Fig. 2. Isolation of phenolic constituents from the ethyl acetate extract of Tohoku licorice (1).

上述のようにして, 未知の成分をも含め, 27 種の化合物を単離できた. 東北甘 草には非常に多様な成分が含有されており, このような手順による分離は, ど のような物質が VRE に対する作用を有するのかが未解明な段階で, 有用な方法 と考えられた.

このようして得た化合物の同定および新規化合物の構造決定については 2.2 以降で述べる.

2-1-2. 甘草の酢酸エチルエキスからの 4'-*O*-methylglycybenzofuran, neoglycybenzofuran 等の単離

上述の方法によって化合物間の各種カラムクロマト担体上での溶出挙動が判 明したため、甘草の酢酸エチルエキスについて、別途、ODS-gelを主として使用 した分離を試みた. Fig. 3に概要を示すように、ODS-gelカラムクロマトによって 得られた画分についてさらにMCI-gel CHP-20Pによるカラムクロマトを行い分 画精製し、HPLC分取によって16種類の化合物を単離した.



glycyrrhizaisofavone B (12),³⁷⁾ glycyrrhisofavone (13),³⁸⁾ 7-*O*-methylluteone (14),³⁹⁾ 8- γ , γ -dimethylallyl)-wighteone (15),⁴⁰⁾ isoangustone A (17),⁴¹⁾ glyasperin J (22),⁴²⁾ glyasperin J trimethyl ether (23),⁴³⁾ glyasperin C (24),²⁸⁾ licoricidin (25),⁴³⁾ 3'-(γ , γ -dimethylallyl)-kievitone (26),⁴⁴⁾ licopyranocoumarin (27),⁴⁵⁾ demethylhomopterocarpan (32),⁴⁶⁾ glycybenzofuran (38),⁴⁷⁾ 4'-*O*-methylglycybenzofuran (39), neoglycybenzofuran (40) licoriphenone (41).⁴⁸⁾

Fig. 3. Isolation of phenolic constituents from the ethyl acetate extract of Tohoku licorice (2).

2-2. 既知フェノール性成分の同定

東北甘草から単離した化合物 1~43 のうち 39 種は既知化合物で, それぞれ MS スペクトル, NMR スペクトル, CD スペクトルによって構造を推定し, 主とし て NMR スペクトルデータの文献値との比較により同定した. また, 標品が利用 可能なものに関しては HPLC 上での直接比較をも行った.

それぞれ, kaempferol-3-O-methyl ether (1), kaempferol (2), isolicoflavonol (3), 6"-O-acetylliquiritin (4), liquiritin (5), liquiritigenin (6), isoliquiritin (7), allolicoisoflavone B (8), formononetin (9), semilicoisoflavone B (10), glycyrrhizaisofavone B (12), glycyrrhisofavone (13), 7-O-methylluteone (14), 8-(γ , γ -dimethyl-allyl)-wighteone (15), gancaonin G (16), isoangustone A (17), 6,8-diprenylorobol (18), glicoricone (19), licoricone (20), glyasperin D (21), glyasperin J (22), glyasperin J trimethyl ether (23) glyasperin C (24), licoricidin (25), $3^{2}-(\gamma,\gamma-dimethylallyl)$ -kievitone (26),licopyranocoumarin (27), isoglycycoumarin (28), licoarylcoumarin (29), glycyrin (30), glycycoumarin (31), 3-(*p*-hydroxyphenyl)-7-methoxycoumarin (43),demethylhomopterocarpan (32), glycyrol (33), isoglycyrol (34), gancaonin I (36), licocoumarone (37), glycybenzofuran (38), licoriphenone (41), p-hydroxybenzoic acid (42) と同定され, Fig. 4 に示すようにこれらのうち化合物 1~3 はフラボノール, 化合物 4~6 はフラバノン、化合物 7 はカルコン、化合物 8~20 はイソフラボン、 化合物 21, 24, 25 はイソフラバン、化合物 22, 23, 26 はイソフラバノン、化合物 27 ~31 および化合物 43 は 3-アリルクマリン、化合物 32 はプテロカルパン、化合 物 33,34 はクメスタン, 化合物 36~38 は 2-アリルベンゾフラン, 化合物 41 はべ ンジルフェニルケトン、化合物 42 は単純フェノールカルボン酸の構造を有して いる.

このように甘草の酢酸エチルエキスは多様なフェノール性成分から構成され ることがあらためて確認された.

14

フラボノール類



フラバノン類



カルコン類



Fig. 4. Structures of 39 known compounds isolated from licorice (1). (Continued)

イソフラボン類



Fig. 4. Structures of 39 known compounds isolated from licorice (2). (Continued)

イソフラバン類



イソフラバノン類



Fig. 4. Structures of 39 known compounds isolated from licorice (3). (Continued)

3-アリルクマリン類



プテロカルパン類



クメスタン類



Fig. 4. Structures of 39 known compounds isolated from licorice (4). (Continued)

2-アリルベンゾフラン類



ベンジルフェニルケトン類



単純フェノールカルボン酸類



Fig. 4. Structures of 39 known compounds isolated from licorice (5).

2-3. 新規化合物の構造決定

2-3-1. 5,7-Di-O-methylluteone (11) の構造



化合物 11 は淡黄色微結晶性粉末として得た. 分子式は,高分解能 FAB-MS 上 での[M+H]⁺イオンピーク(*m*/*z*: 383.1448) に基づき, C₂₂H₂₃O₆ と決定した. また MeOH 中での UV スペクトルで,210 (log ε 4.15),258 (4.08), 291sh, 340 nm (3.93) に吸収極大がみられたことから,イソフラボン骨格を推定した.



Fig. 5. ¹H NMR Spectrum of compound **11** (600 MHz, CD₃OD, 27 $^{\circ}$ C).

本化合物の ¹H NMR スペクトル (Fig. 5) は, イソフラボンの 2 位に特徴的な シングレットシグナルを $\delta_{\rm H}$ 7.95 に示し, また $\delta_{\rm H}$ 6.34 にイソフラボンの A 環の プロトンに帰属されるシングレットを示した. さらに $\delta_{\rm H}$ 6.82 (1H, d, J = 2.4 Hz), $\delta_{\rm H}$ 6.92 (1H, dd, J = 2.4, 8.4 Hz), $\delta_{\rm H}$ 8.02 (1H, d, J = 8.4 Hz) に, ABX 系を形成するプ ロトンシグナルを示し、これらはイソフラボンの B 環のプロトンに帰属された. これらの他、プレニル基に由来する特徴的なシグナルを $\delta_{\rm H}$ 1.64 (3H, s), $\delta_{\rm H}$ 1.73 (3H, s), $\delta_{\rm H}$ 3.38 (2H, d, J = 6.9 Hz), および $\delta_{\rm H}$ 5.14 (1H, t, J = 7.4 Hz) に、また二つの methoxyl 基のシグナルを $\delta_{\rm H}$ 3.43 (3H, s) および $\delta_{\rm H}$ 3.78 (3H, s) に示した.

これらの¹H-NMR の各シグナルについて, 化合物 14 の¹H NMR スペクトル と比較すると (Fig. 6), B 環のプロトンのケミカルシフトに差はみられるが, 各 シグナルのカップリングパターンはよく似ている. また, 同じくプレニル基お よび2個のメトキシ基を有するイソフラボンの licoricone (20) のシグナルパター ンは全体として化合物 11 のそれと非常によく似ており, 化合物 11 は licoricone (20) の異性体に相当すると考えられた.



Fig. 6. ¹H NMR Spectra of the compound **20**, **14** and **11** (600 MHz, CD₃OD, 27 $^{\circ}$ C).

化合物 11 の¹³C-NMR スペクトル (Fig. 7) は、イソフラボン骨格に帰属される

シグナルを δ_c 96.4 (C-8), 103.3 (C-3'), 106.5 (C-4a), 115.6 (C-6), 116.8 (C-5'), 117.5 (C-1'), 119.9 (C-3), 128.2 (C-6'), 156.7 (C-8a), 157.1 (C-4'), 159.2 (C-5), 160.0 (C-2'), 160.4 (C-7), 170.1 (C-2), 178.8 (C-4) にそれぞれ示した (Table 2). また, プレニル 基のシグナルを δ_c 17.7, δ_c 25.4 (C-3"上の gem-dimethyl), δ_c 23.5 (C-1"), δ_c 125.2 (C-2"), および δ_c 130.9 (C-3") に, 2 個のメトキシ基のシグナルを δ_c 55.9 および δ_c 61.3 に示した. これらのシグナルによって構成されるシグナルパターンは, licoricone (20) の ¹³C NMR スペクトルのシグナルパターンとよく似ていたが, 化 合物 11 の C-2 シグナル (δ_c 170.1) が licoricone (20) の対応する炭素のシグナル (δ_c 158.6)²⁸⁾ および 7-*O*-methylluteone (14) の対応する炭素のシグナル (δ_c 158.9) と比較すると大きな差を示した (Fig. 7, Table 2).



Fig. 7. ¹³C NMR Spectrum of compound **11** and licoricone (**20**) (151 MHz, CD₃OD, 27 $^{\circ}$ C).

	Compound 11	Licoricone (20)	7- <i>O</i> -Methylluteone (14)
Position	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m C}$
C-2	170.1	158.6	158.9
C-3	119.9	119.3	120.1
C-4	178.8	177.6	180.1
C-4a	106.5	116.3	106.7
C-5	159.2	128.3	159.3
C-6	115.6	115.6	115.8
C-7	160.4	162.3	161.5
C-8	96.4	103.2	97.2
C-8a	156.7	159.5	156.9
C-1'	117.5	104.6	118.0
C-2'	160.0	157.2	160.3
C-3'	128.2	97.1	104.8
C-4'	157.1	158.9	158.4
C-5'	116.8	112.6	117.2
C-6'	103.3	160.0	104.6
C-1"	23.5	23.4	24.6
C-2"	125.2	125.0	125.9
C-3"	130.9	130.5	131.3
C-4"	17.7	17.8	17.8
C-5"	25.7	25.8	25.8
5-OCH ₃	61.3	61.1	
7-OCH ₃	55.9	55.9	56.1

Table 2. NMR Spectroscopic data for compound **11**, licoricone (**20**) and 7-*O*-methylluteone (**14**) (150 MHz, CD₃OD, 27 $^{\circ}$ C).

化合物 **11** の ¹³C NMR の各シグナルの帰属を確認するため, HMBC を測定した (Fig. 8, Fig. 9, Table 3). 化合物 **11** の HMBC スペクトル上では, H-2 シグナル (δ_{H} 7.95) は, C-3 (δ_{C} 119.9), C-4 (δ_{C} 178.8) および C-1'の各シグナル (δ_{C} 117.5) と相関 が観察された.また, H-5'シグナル (δ_{H} 6.92) は C-1'シグナル (δ_{C} 117.5) と, また, H-3'および H-6'の各シグナルは水酸基の付け根の各炭素との間に Fig. 8 に示す ような各相関を示した (H-3'→C-2', C-4'; H-6'→C-2'). 他方, A 環上の H-8 シグナ ル(δ_{H} 6.34) は C-4a (δ_{C} 106.5), C-6 (δ_{C} 115.6), C-8a (δ_{C} 156.7), および C-7 (δ_{C} 160.4) の各シグナルとの間に相関を示した. さらにプレニル基の H-1"シグナル ($\delta_{\rm H}$ 3.38) は, C-2"($\delta_{\rm C}$ 125.2)の他に, C-6 ($\delta_{\rm C}$ 115.6), C-5 ($\delta_{\rm C}$ 159.2),および C-7 ($\delta_{\rm C}$ 160.4) の各シグナルと相関を示し、プレニル基は C-6 位に結合していることが確かめられた.さらに二つのメトキシ基のシグナルのうち、 $\delta_{\rm H}$ 3.78のシグナルが C-5 ($\delta_{\rm C}$ 61.3)と、また $\delta_{\rm H}$ 3.43のシグナルが C-7 ($\delta_{\rm C}$ 55.9)と相関が見られた.



Fig. 8. HMBC Correlations observed for compound 11.



Fig. 9. HMBC Spectrum of compound 11 (600 MHz, CD₃OD, 27 $^\circ\!\mathrm{C}$).

Compound 11			
Position	$\delta_{ m C}$	$\delta_{\rm H} \left(J \text{ in Hz} \right)$	HMBC
C-2	170.1	7.95 (s)	
C-3	119.9		H-2
C-4	178.8		H-2
C-4a	106.5		H-8
C-5	159.2		H-1"
C-6	115.6		H-8, H-1"
C-7	160.4		H-8, H-1"
C-8	96.4	6.34 (s)	
C-8a	156.7		H-8
C-1'	117.5		H-2, H-5'
C-2'	160.0		H-3', H-6'
C-3'	128.2	6.82 (d, 2.4)	
C-4'	157.1		H-3'
C-5'	116.8	6.92 (dd, 2.4, 8.4)	
C-6'	103.3	8.02 (d, 8.4)	
C-1"	23.5	3.38 (d, 6.6)	H-4'
C-2"	125.2	5.14 (t, 6.6)	H-1"
C-3"	130.9		H-4", H-5"
C-4"	17.7	1.73 (s)	H-1"
C-5"	25.7	1.64 (s)	H-1"
5-OCH ₃	61.3	3.78 (s)	
7-OCH ₃	55.9	3.43 (s)	

Table 3. ¹H and ¹³C NMR Assignments and HMBC correlations for compounds **11** (600 MHz, CD₃OD, 27 $^{\circ}$ C).

これらから, 化合物 **11** について 5,7-di-*O*-methylluteone の構造を決定した.上述の各相関は, この構造でいずれも矛盾なく説明できる.

2-3-2. Demethylglycyrol (35) の構造



化合物 **35** は淡黄色微結晶性粉末として得た. この化合物は高分解能 FAB-MS で[M+H]⁺イオンピークを *m/z* **353.0990** に示し,分子式は C₂₀H₁₇O₆ で表される.また MeOH 中での UV スペクトルは,吸収極大を 210 (log ε 4.47), 259 (4.45), 345 nm (4.23) に示し, クメスタン骨格を有する glycyrol (**33**)³¹⁾ と類似のスペクトル を示した (Fig. 10).



Fig. 10. UV Spectra of compounds 33 and 35



Fig. 11. ¹H NMR Spectrum of compound **35** (600 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

本化合物の¹H NMR スペクトル (Fig. 11) では、芳香族プロトン領域にクメス タン骨格 A 環の H-4 に帰属されるシグナルを $\delta_{\rm H}$ 6.25 に示したほか、 $\delta_{\rm H}$ 6.80 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-10), $\delta_{\rm H}$ 6.71 (1H, dd, J = 2.4, 8.4 Hz, H-8), および $\delta_{\rm H}$ 7.25 (1H, d, J =8.4 Hz, H-1) に ABX 系を構成するシグナルを示した.また 3-アリルクマリン骨 格の H-4 に相当する H-11a のシグナルが見られないことから、化合物 35 はクメ スタンの構造を有することが示唆された.これらのほか、プレニル基に帰属さ れるシグナルを $\delta_{\rm H}$ 1.60, $\delta_{\rm H}$ 1.77 (3H each, s; C-3'上の *gem*-dimethyl), $\delta_{\rm H}$ 3.12 (2H, d, J = 6.6 Hz, C-1'), および $\delta_{\rm H}$ 5.07 (1H, t, J = 6.6 Hz, C-2') に示した.これらの各シ グナルが示すパターンは、化合物 33 の¹H NMR スペクトルとよく似ていたが、 化合物 35 の¹H NMR スペクトルのシグナル中にメトキシ基のシグナルが認めら れなかったことから、化合物 35 について demethylglycyrol (35) の構造を推定し た.



Fig. 12. ¹³C NMR Spectrum of compound **35** (151 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 **35**の¹³C NMR スペクトル (Fig. 12, Table 4) では, クメスタン骨格に帰属される 15 個のシグナルのほか, プレニル基に帰属される各シグナルをδc 17.9, 25.8 (C-3'上の gem-dimethyl), 23.3 (C-1'), 125. 1(C-2'), 130.5 (C-3') に示した.

		Compound 35	
Position	$\delta_{ m C}$	$\delta_{ m H}$ (J in Hz)	HMBC
C-1	160.4		H-1'
C-2	113.9		H-4, H-1'
C-3	158.5		H-4, H-1'
C-4	99.4	6.25 (s)	
C-4a	156.4		H-4
C-6	160.1		
C-6a	104.0		
C-6b	114.9		
C-7	98.4	6.80 (d, 2.4)	
C-8	111.9	6.71 (dd, 2.4, 8.4)	
C-9	156.6		
C-10	120.0	7.25 (d, 8.4)	
C-10a	156.1		
C-11a	158.6		
C-11b	104.1		H-4
C-1'	23.2	3.12 (d, 6.6)	
C-2'	125.1	5.07 (t, 6.6)	H-1', H-4'
C-3'	130.5		H-1', H-4', H-5'
C-4'	25.8	1.60 (s)	H-5'
C-5'	17.9	1.77 (s)	H-4'

Table 4. ¹H and ¹³C NMR Assignments and HMBC correlations for compound **35** (600 MHz and 150 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 **35** の HMBC スペクトルでは, H-4 シグナル ($\delta_{\rm H}$ 6.25) は, Fig. 13, Fig. 14 に示すように, C-11b (δ_c 104.1), C-2 (δ_c 113.9), C-4a (δ_c 156.4), および C-3 (δ_c 158.5) の各シグナルと相関を示した.また,プレニル基の H-1"シグナル ($\delta_{\rm H}$ 3.12) は, C-2' (δ_c 125.1) および C-3' (δ_c 130.5) のシグナルと相関を示したほか, C-2 (δ_c 113.9), C-3 (δ_c 158.5), C-1 (δ_c 160.4) の各シグナルと相関を示した. これらの相関は, プレニル基が 2 位に結合しているとして矛盾なく説明できる.



Fig. 13. HMBC Correlations observed for compound **35**.



Fig. 14. HMBC Spectrum of compound **35** (600 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 35 と既知化合物 glycyrol (33) は、メトキシル基の有無を除いて同一の 骨格および置換様式を有すると推定されたことから、化合物 35 の構造を確認す るため、両者のメチル化を行った. その結果、いずれの化合物からも同一の dimethyl 体 (既知化合物 1-O-methylglycyrol, 44)³⁴⁾ および trimethyl 体 (1,9dimethylglycyrol, 45) が得られた (Fig. 15). これらにより、化合物 35 は demethylglycyrol の構造を有することが確かめられた.



Fig. 15. Methylation of compound 35 and glycyrol (33).
2-3-3. 4'-O-Methylglycybenzofuran (39) の構造



本化合物は淡褐色粉末として得られた.この化合物は高分解能 FAB-MS で [M+H]⁺ イオンピークを m/z 369.1709 に示し,分子式は C₂₂H₂₅O₅ で表される.また MeOH 中での UV スペクトルは既知化合物の glycybenzofuran (38) と類似しており,吸収極大を 214 (log ε 4.11), 238 (4.01), 305 nm (4.52) に示したことから,これらと同様の 2-アリルベンゾフラン骨格を持つことが示唆された (Fig. 16).



Fig. 16. UV Spectr of compounds 38 and 39.

本化合物の¹H-NMR スペクトル (Fig. 17) では, $\delta_{\rm H}$ 7.30 (d, J = 8.4 Hz, H-4), $\delta_{\rm H}$ 6.87 (d, J = 2.4 Hz, H-7), および $\delta_{\rm H}$ 6.77 (dd, J = 2.4, 8.4 Hz, H-5) に ABX 系を形成 したシグナルが現れ, これらは 2-アリルベンゾフランの A 環上のプロトンに帰属される. また, B 環上の H-5'に帰属される $\delta_{\rm H}$ 6.41 (s) のシグナルが観察された. さらに脂肪族プロトン領域にプレニル基に由来する特徴的なシグナルが $\delta_{\rm H}$ 1.60, $\delta_{\rm H}$ 1.70 (3H each, s; C-3"上の gem-dimethyl), $\delta_{\rm H}$ 3.32 (2H, d, J = 6.6 Hz, H-1"), およ び $\delta_{\rm H}$ 5.16 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-2") に, また二つのメトキシ基のシグナルが $\delta_{\rm H}$ 3.82 および $\delta_{\rm H}$ 3.35 (3H each, s) に認められた. これらのシグナルとともに, $\delta_{\rm H}$ 1.89 (3H each, s) という高磁場領域に, 特徴的なメチル基のシグナルが見られた.



Fig. 17. ¹H NMR Spectrum of compound **39** (600 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 **39** の ¹³C NMR スペクトル (Fig. 18) では 2-アリルベンゾフラン骨格に, 帰属される 14 個のシグナルのほか, プレニル基に由来する特徴的な 5 個のシグ ナルが $\delta_{\rm C}$ 17.2 (C-5"), $\delta_{\rm C}$ 22.5 (C-1"), $\delta_{\rm C}$ 25.3 (C-4"), $\delta_{\rm C}$ 124.3 (C-2"), および $\delta_{\rm C}$ 129.9 (C-3") に,また 2 個のメトキシ基のシグナルが $\delta_{\rm C}$ 60.7 および $\delta_{\rm C}$ 55.0 に現れた. これらに加えて,高磁場にメチル基の炭素のシグナル ($\delta_{\rm C}$ 7.9) が観察された.



Fig. 18. ¹³C NMR Spectrum of compound **39** (151 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 **39**の HMBC スペクトルでは, A 環の H-4 シグナル ($\delta_{\rm H}$ 7.30) が, C-5 ($\delta_{\rm C}$ 111.5), C-6($\delta_{\rm C}$ 155.8), および C-8 の各シグナル ($\delta_{\rm C}$ 156.2) と相関を示した.また H-5 および H-7 の各シグナルも A 環上の各炭素との間に Table 5 に示すような各 相関を示した (H-5→C-6; H-7→C-6, C-8, C-9). さらに B 環の H-5' ($\delta_{\rm H}$ 6.41) は $\delta_{\rm C}$ 102.1 (C-1'), 114.2 (C-3'), $\delta_{\rm C}$ 160.0 (C-4') 及び $\delta_{\rm C}$ 153.1 (C-6') との相関が観察され た.また B 環上の 2 つのメトキシ基およびプレニル基のプロトンおよび炭素シ グナルについても, Fig. 19, Fig. 20 に示すような相関が観察され, これによってプ レニル基が 2 つのメトキシ基と隣接した位置に結合していることが説明できた. NOESY スペクトルにおいては, C-4'位のメトキシ基と H-5'との間に相関が認 められ, 2 つのメトキシ基のプロトンの区別が明確になった.さらに C-3 のメチ ル基のシグナルは A 環の H-4 のプロトンのシグナル ($\delta_{\rm H}$ 7.30) 及び B 環の C-2' 上のメトキシ基のプロトンのシグナル ($\delta_{\rm H}$ 3.82) と相関が観察され, C-3 上にメ チル基が結合していることが明確に示された.

		Compound 39	
Position	$\delta_{ m C}$	$\delta_{\rm H}(J \text{ in Hz})$	HMBC
C-2	145.7		H-10
C-3	114.2		H-10
C-4	119.6	7.30 (d, 8.4)	
C-5	111.5	6.77 (dd, 2.4, 8.4)	H-4
C-6	155.8		H-5, H-7
C-7	97.9	6.87 (d, 2.4)	
C-8	156.2		H-4, H-7
C-9	123.0		H-5, 7, 10
C-10	7.9	1.89 (s)	
C-1'	102.1		H-5'
C-2'	158.9		H-1"
C-3'	114.2		H-5', H-2"
C-4'	160.0		H-5', H-1"
C-5'	96.6	6.41 (s)	
C-6'	153.1		H-5'
C-1"	22.5	3.32 (d, 6.6)	
C-2"	124.3	5.16 (t, 6.6)	
C-3"	129.9		H-4", H-5"
C-4"	17.2	1.60 (s)	
C-5"	25.3	1.70 (s)	
-OCH ₃	60.7	3.82 (s)	H-2""
-OCH ₃	55.0	3.35 (s)	H-4""

Table 5. ¹H and ¹³C NMR Assignments and HMBC correlations for compounds **39** (600 MHz and 150 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).



Fig. 19. HMBC Spectrum of compound **39** (600 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).



Fig. 20. HMBC and NOESY correlations observed for compound 39.

化合物 **39** と既知化合物の glycybenzofuran (**38**) は,同一の骨格を有すると推定 されたことから,化合物 **39** の構造を確認するために,両者のメチル化を行った. その結果, Fig. 21 に示すように同一のメチル化物 glycybenzofuran trimethyl ether (**46**) が得られたので,化合物 **39** は **4**'-*O*-methylglycybenzofuran の構造を有するこ とが確かめられた.



Fig. 21. Methylation of compound **39** and glycybenzofuran (**38**).

2-3-4. Neoglycybenzofuran (40) の構造



本化合物は淡褐色粉末として得られた,この化合物は高分解能 FAB-MS で $[M+H]^+$ イオンピークを m/z 369.1709 に示したことに基づき glycybenzofuran (38) と同じく $C_{21}H_{23}O_5$ の分子式で表されることが明らかになった.また MeOH 中で の UV スペクトルは吸収極大を 210 (log ε 4.09), 238 (4.21), 300 nm (4.30) に示し, これは化合物 39 とよく似ており,同様の 2-アリルベンゾフラン骨格を持つこと が推定された (Fig. 22).



Fig. 22. UV Spectra of compounds 38, 39, and 40.

本化合物の¹H-NMR スペクトル (Fig. 23) では, 2-アリルベンゾフランの $\delta_{\rm H}$ 7.23 (d, J = 8.4 Hz, H-4), $\delta_{\rm H}$ 6.82 (d, J = 2.4 Hz, H-7), および $\delta_{\rm H}$ 6.71 (dd, J = 2.4, 8.4Hz, H-5) に ABX 系を形成する A 環上の 3 つのプロトンに帰属されるシグナル を示すとともに, B 環の H-5'に帰属されるシグナルを $\delta_{\rm H}$ 6.41 (s) に示した. さら にプレニル基に由来する特徴的なシグナルを $\delta_{\rm H}$ 1.63, $\delta_{\rm H}$ 1.69 (3H each, s; C-3"上 の *gem*-dimethyl), $\delta_{\rm H}$ 3.13 (2H, d, J = 6.6 Hz, H-1"), および $\delta_{\rm H}$ 5.12 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-2") に示し, またメトキシ基のシグナルを $\delta_{\rm H}$ 3.28 (3H, s) に示した. さらに, これらのシグナル以外に高磁場領域に特徴的なメチル基のシグナル [$\delta_{\rm H}$ 1.97 (3H, s)] が見られた.



Fig. 23. ¹H NMR Spectrum of compound **40** (600 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 **40** の ¹H NMR スペクトルを化合物 **39** および glycybenzofuran (**38**) のス ペクトルと比較したところ, Fig. 24 に示すように, 化合物 **39** の ¹H-NMR スペク トル中の δ_H 3.82 のメトキシ基のシグナルが 1 つ多いことを除いて, この 3 種の 化合物はよく似たスペクトルを示しており, 化合物 **40** が glycybenzofuran (**38**) の 異性体であることとよく対応している.



Fig. 24. ¹H NMR Spectra of the compound **39**, **38**, and **40** (600 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 **39** の ¹³C NMR スペクトルでは (Fig. 25), 2-アリルベンゾフラン骨格に, 帰属される 14 個のシグナルのほか, プレニル基の由来する特徴的な 5 個のシグ ナルを δ_{c} 17.8 (C-5"), δ_{c} 22.9 (C-1"), δ_{c} 25.5 (C-4"), δ_{c} 124.6 (C-2"), および δ_{c} 129.7 (C-3") に, メトキシ基のシグナルを δ_{c} 60.6 に示した. さらに, これらに加えて, 高磁場にメチル炭素のシグナル δ_{c} 8.7 が観察された.



Fig. 25. ¹³C NMR Spectrum of compound **40** (151 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 **40** の ¹H および ¹³C NMR の各シグナルのケミカルシフトについて, そ の異性体とみなしうる glycybenzofuran (**38**) と比較すると, Fig. 26 に示すように, ¹H NMR だけでなく ¹³C NMR も含めて両者は非常に良く似ており, glycybenzofuran (**38**) が B 環の 2'位にメトキシ基を有するのに対して, 化合物 **40** は 4'位または 6'位のいずれかの水酸基がメトキシ基となったものであることが 推定された.



Fig. 26. Comparisons of the NMR spectral data for compound **40** and glycybenzofuran (**38**).

そこでさらに化合物 40 の HMBC スペクトルおよび NOESY スペクトルを測 定したところ, Fig. 27, Fig. 28 および Table 6 に示した各相関が認められ, 化合物 **40**はB環のC-4'上にメトキシ基が結合した構造を有することが明らかになった. すなわち,HMBC上ではH-5'($\delta_{\rm H}$ 6.41) およびメトキシ基のプロトン ($\delta_{\rm H}$ 3.28) が いずれも C-4'との相関を示すとともに, NOESY 上でこのメトキシ基のシグナル と H-5'およびプレニル基の H-2"のプロトン ($\delta_{\rm H}$ 5.12) とが相関を示し,メトキ シ基が 4'位に結合していることが裏付けられた.



Fig. 27. HMBC and NOESY Correlations observed for compound 40.



Fig. 28. HMBC Spectrum of compound **40** (600 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

		Compound 40	
Position	$\delta_{ m C}$	$\delta_{\rm H} \left(J \text{ in Hz} \right)$	HMBC^{b}
C-2	145.5		H-10
C-3	114.4		H-10
C-4	119.3	7.23 (d, 9.0)	
C-5	111.4	6.71 (dd, 2.4, 9.0)	
C-6	155.7		H-4, 5, 7
C-7	97.8	6.82 (d, 2.4)	
C-8	156.2		H-4, H-7
C-9	123.8		H-5, 7, 10
C-10	8.7	1.97 (s)	
C-1'	103.5		H-5'
C-2'	159.1		H-1"
C-3'	112.9		H-5', 1", 2"
C-4'	160.0		H-5', H-1"
C-5'	98.7	6.28 (s)	
C-6'	155.7		H-5'
C-1"	22.9	3.13 (d, 6.6)	
C-2"	124.6	5.12 (t, 6.6)	
C-3"	129.7		H-4", H-5"
C-4"	17.8	1.69 (s)	
C-5"	25.5	1.63 (s)	
-OCH ₃	60.6	3.28 (s)	H-4""

Table 6. ¹H and ¹³C NMR Assignments and HMBC correlations for compounds **40** (600 MHz and 150 MHz, acetone- d_6 , 27 °C).

化合物 40 と既知化合物の glycybenzofuran (38) は、同一の骨格を有すると推定 されたことから、化合物 40 の構造を確認するために、両者のメチル化を行った. その結果、Fig. 29 に示したように同一のメチル化物が得られ、推定構造が裏付け られた. 化合物 40 は neoglycybenzofuran と命名した.



Fig. 29. Methylation of compound **40** and glycybenzofuran (**38**).

2-4. イソフラボンの¹H NMR スペクトル上の2位のシグナルのケミカルシフトと構造上の特徴

本研究の過程で、東北甘草から新規化合物を含めて多くのイソフラボン類が 単離された.これらの¹H NMR スペクトル上ではいずれもその2位のシングレ ットシグナルが低磁場に現れることが特徴的である.しかしその構造に依存し て、2位のプロトンのケミカルシフトに若干の差異が見られた.また、A 環および B 環の各シグナルについてはその置換様式によって、ABX 系を構成する各シグ ナルやシングレットシグナルなどが現れるが、その帰属のさせ方によっては、 誤った構造を導く可能性がある.

そこで,これらそれぞれの¹H NMR スペクトルについて以下のように比較を 行い,その構造との関係について検討した.

Fig. 30, Fig. 31 に示すように, 化合物 16 および 18 では B 環の置換基として水酸基だけが結合している. このような場合は H-2 シグナルが大きく低磁場シフトを示した [δ 8.20 (16) および δ 8.21 (18)]. また, 化合物 13 では B 環の置換基 として水酸基とプレニル基が結合しており, この場合は H-2 シグナルが δ 7.91 (13) に現れ, 化合物 16 および 18 と比較すると大きく高磁場シフトを示した. 化合物 20 のように B 環の置換基として水酸基と 2 つのメトキシ基およびプレニル 基が結合していると H-2 シグナルは δ 8.10 (20) に現れ, 化合物 13 と比較すると 低磁場シフトを示した. また, 化合物 17 の場合は, A, B 環の各置換基としてそ れぞれ水酸基およびプレニル基が結合している. この場合は, H-2 シグナルは低 磁場シフトを示した [δ 8.05 (17)]. これに対して, 化合物 11, 14 では B 環の置換 基として 2 個の水酸基が結合し, また A 環の置換基として, プレニル基ととも に水酸基 1 個とメトキシ基各 1 個, または 2 個のメトキシ基が結合しており, こ れらの場合は H-2 シグナルが δ 7.97 (11) および δ 8.09 (14) に現れた.



Fig. 30. ¹H NMR Spectra of compounds **8**, **11**, **13**, **14**, **16**, **17**, **18**, and **20** (in acetone-*d*₆).



Fig. 31. Structures of isoflavons isolated from Tohoku licorice.

これらのイソフラボンの2位のプロトンの帰属については, HSQC相関によって¹³CNMR スペクトル上の150~170ppm 付近の C-2 シグナルと対応させることによって確認することが可能である.

化合物 8 と化合物 13 は A と C 環の部分は同じであり, 両者の B 環について 比較すると化合物 8 はクロメン構造を形成し, 化合物 13 では置換基としてプレ ニル基を有するという違いがある. それによって 2 位のプロトンのケミカルシ フトに 0.24 ppm という大きな差異が生じているが、これは化合物 8 における B 環のクロメン構造の存在による共役系の変化として説明しうる.

また, 化合物 13 と 17 は B 環部分について同一の置換様式を有しているが, 化 合物 17 は A 環の 6 位にプレニル基を有する点のみが異なっているにも関わら ず, 2 位のプロトンのケミカルシフトを比較すると 17 では 0.14 ppm 低磁場シフ トしている. これは A 環のプレニル基の導入による A-C 環部分の電子密度の変 化の結果として説明される.

化合物 11 と 14 は構造上, A 環の 5 位のメトキシ基と水酸基だけの違いがある が,5 位に水酸基を有する化合物 14 は 11 に比べて 2 位のプロトンが 0.12 ppm 低 磁場シフトしており,これは 5 位のメトキシ基が水酸基に置き換わったことに よって C 環の共役ケトンの平面性が増大したためであるとして説明できる. す なわち,化合物 11 では"かさ高い"メトキシ基がケトンの近傍 (5 位) に存在する ため,4 位のケトンは A, C 環によって構成されるクロモン環構造の平面からのず れを生じ,それによって 2,3 位の 2 重結合との共役性が低下し,⁶⁸⁾ そのために 2 位のプロトンがより高磁場に現れるが,化合物 14 では 5 位が水酸基となるため に,4 位のケトンと水素結合を形成し, A-C 環の平面性が増大し,共役性が増大 して,その結果,2 位のプロトンが低磁場にシフトすると考えられる.



また, 化合物 14 において B 環の 6' 位のプロトンのケミカルシフトに着目し たとき, 化合物 11 に比べて高磁場シフトを示している点については, 結果的に A-C 環平面に対する B 環の形成する角度が影響を受け, B 環の A-C 環に対する 角度が増大し, それによって, 6' 位のプロトンに対する A-C 環平面の異方性効 果が顕著に現れたとして説明される.

第3章 甘草から単離したフェノール性成分の VRE に対する抗菌効果の検討

腸球菌はヒトや動物の腸内に存在する常在菌であるが,疾患等によって宿主 の免疫力が低下している状態では,各種の炎症・感染症や敗血症に関与する可能 性がある.

現在,日本では MRSA や薬剤耐性緑膿菌など多くの抗生物質耐性菌が問題化 しているが,こうした種々の抗生物質耐性菌に対する"最後の砦"ともいうべき ものがバンコマイシンであった.それにもかかわらず,バンコマイシンに対す る耐性を獲得したのが VRE であるが,VRE の場合はバンコマイシンだけでなく, 多種類の抗菌剤に対して耐性を示すことが少なからず見られ,VRE 感染症が拡 大すれば深刻な問題となる.VRE 感染症は 1988 年に英国で報告されて以来,欧 米を中心に VRE の重症感染例が報告されており,日本でも 1996 年に尿路感染 症患者から見出されて以来,散発的ではあるが報告があり,拡大への警戒が必 要な状態である.⁴⁷⁻⁵⁰

バンコマイシンはグリコペプチド系抗生物質で、ペプチドグリカン前駆体の D-alanyl-D-alanyl 構造の末端に結合することによって細胞壁合成を阻害し、菌の 増殖が抑えられる. VRE では、バンコマイシンの標的部位となる、このペプチド グリカン前駆体末端が変化することにより、バンコマイシンによる結合性が低 下するとされている.⁴⁸⁾ VRE のペニシリン結合タンパク (penicillin binding protein, PBP) 部分の変異として VanA, VanB, VanC など数種のタイプが知られており、そ れぞれ結合酵素 (ligase) 遺伝子として vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG が存 在する. これらの変異については、抗生剤に対する耐性にも差があるとされ る.⁵⁰⁻⁵⁴⁾

腸球菌の中で,臨床上,特に問題となるのは,主として E. faecalis および E. faecium であり,これらはグラム陽性菌の中でブドウ球菌とともに最も多剤耐性 化しているとされる.元来,腸球菌はゲンタマイシン,カナマイシンのようなア ミノグリコシド系薬剤,あるいはセフェム系薬剤に対しては薬剤の細胞内への 取り込みが低いため,これらに対して自然耐性である.また,ペニシリン耐性に ついては, E. faecalis ではペニシリン分解酵素によって耐性化しており, E. faecium ではペニシリン結合タンパク質の変化による耐性を示す.このようにし て,臨床分離される VRE の多くは現存するほとんどすべての抗生剤に耐性を獲 得しているとされる.⁴⁷⁾ こうした状況の中で VRE に対する新たな抗菌作用物質の開発が求められてい る.特に漢方医学など伝統医学で使用されてきた生薬由来成分については,少 なくともその急性毒性については,長い利用経験の中で明らかにされてきてい ることから,低毒性の抗菌作用物質開発の素材として重要と考えられる.中で も甘草については,本学生薬学教室を含めて多くの研究グループによってその フラボノイドや関連のフェノール性成分の解明が進められてきており,本研究 ではこうしたフェノール性成分の解明を進め,上述のように多くの化合物を単 離同定・構造決定してきた.そこで,それらの VRE に対する抗菌作用に対する フェノール性成分の構造の影響について検討を進めた結果,以下に述べるよう に,特徴的な関係が見出された.

3-1. VRE 菌株の性質

本研究では、VREの菌株として、いずれも群馬大学池教授から恵与された臨床 分離株 *E. faecalis* NCTC12201 および *E. faecium* FN-1 が使用され、本学黒田照夫 准教授によって抗菌作用の検討が実施された.

この 2 つの菌株は種々の抗生物質に対して耐性を獲得している. 抗生剤に対 する最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentrations, MIC) は Table 7 に示す 通りで, linezolid などを除いて, 多くの抗生剤・抗菌剤に対する耐性を有するこ とが認められる. Vancomycin の場合, この 2 つの菌種に対する MIC は 100 µg/mL 以上であった.

Table 7. Antibacterial effects of antibiotics and drugs on Enterococci shown by their minimum inhibitory concentrations (μ g/mL).

	MIC	$(\mu g/mL)$
	Enterococcus faecium	Enterococcus facalis
Antibacteriai drugs	FN-1	NCTC12201
oxacillin	>1024	256
gentamicin	>1024	>1024
tetracycline	64	128
erythromycin	>1024	>1024
norfloxacin	>128	4
vancomycin	>100	>100
linezolid	2.5	2.5
imipenem	>64	2

3-2. 甘草のフェノール性成分の VRE に対する抗菌効果の検討

本研究で甘草から単離した種々のタイプのフェノール性化合物のうち,単離 量の少なかった 3-(p-hydroxyphenyl)-7-methoxycoumarin (43) を除き,既知化合物 38 種および新規化合物 4 種について, VRE の 2 種の菌株に対する MIC が測定さ れた. それらの構造は Fig. 32 に示す通りである.



Fig. 32. Licorice phenolics tested anti-VRE effects (1). (Continued)



Fig. 32. Licorice phenolics tested anti-VRE effects (2). (Continued)



Fig. 32. Licorice phenolics tested anti-VRE effects (3).

-	Number	Number	MIC	(ug/mL)
	of	of	Enterococcus	Enterococcus
Compound	-OH	Prenvl	faecium	faecalis
	Group	Group	FN-1	NCTC12201
Flavonols		1		
kaempferol-3- O -methyl ether (1)	2	0	>128	>128
kaempferol (2)	3	0	>128	>128
isolicoflavonol (3)	4	1	>128	128
Flavanones				
6"-O-acetylliquiritin (4)	1	0	>128	>128
liquiritin (5)	1	0	>128	128
liquiritigenin (6)	2	0	>128	>128
Chalcones				
isoliquiritin (7)	2	0	>128	>128
Isoflavons				
allolicoisoflavone B (8)	3	0	>128	128
formononetin (9)	1	0	>128	>128
semilicoisoflavone B (10)	3	0	32	64
5,7-di-O-methylluteone (11)	2	1	64	128
glycyrrhizaisoflavone B (12)	2	0	128	128
glycyrrhisofavone (13)	4	1	32	32
7- <i>O</i> -methylluteone (14)	3	1	32	32
8-(γ , γ -dimethylallyl)-wighteone (15)	3	2	8	16
gancaonin G (16)	2	1	64	128
isoangustone A (17)	4	2	16	16
6,8-diprenylorobol (18)	4	2	128	128
glicoricone (19)	3	1	>128	>128
licoricone (20)	2	1	128	>128
Isoflavans				
glyasperin D (21)	2	1	32	64
glyasperin C (24)	3	1	16	16

Table 8. Antibacterial effects of licorice phenolics on Enterococci shown by their minimum inhibitory concentrations (μ g/mL).

licoricidin (25)	3	2	8	8
Isoflavanones				
glyasperin J (22)	3	1	32	32
glyasperin J trimethyl ether (23)	0	1	64	64
3'-(γ , γ -dimethylallyl)-kievitone (26)	4	2	16	16
3-Arylcoumarins				
licopyranocoumarin (27)	2	0	>128	128
isoglycycoumarin (28)	2	0	64	>128
licoarylcoumarin (29)	3	0	16	16
glycyrin (30)	2	1	16	32
glycycoumarin (31)	3	1	16	16
Pterocarpans				
demethylhomopterocarpan (32)	1	0	32	32
Coumestans				
glycyrol (33)	2	1	128	>128
isoglycyrol (34)	1	0	32	64
demethylglycyrol (35)	3	1	64	64
2-Arylbenzofurans				
gancaonin I (36)	2	1	8	16
licocoumarone (37)	3	1	32	32
gycybenzofuran (38)	2	1	32	32
4'-O-methylglycybenzofuran (39)	2	1	32	32
neoglycybenzofuran (40)	3	1	16	16
Benzylphenylketones				
licoriphenone (41)	3	1	>128	128
Simple phenolcarboxylic acids				
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (42)	1	0	128	128

甘草から単離した化合物の VRE に対する抗菌作用については, 化学構造によってその強弱に著しい差が認められた.

まず、フェノール性成分の骨格による差異について見ると、以下のような特 徴が見られる.

1) フラボノール類, フラバノン類, およびカルコン類:本研究で対象とした化合物 7種中7種で *E. faecium* に対しては 128 μg/mL の濃度で抗菌作用を示さず, また, *E. faecalis* に対しても, 抗菌活性は弱い (7種中2種が MIC 128 μg/mL) か, または 128 μg/mL の濃度で抗菌作用を示さなかった (7種中5種).

2) イソフラボン類に: *E. faecium* に対してほとんど抗菌作用を示さない (MIC 128 μg/mL またはそれ以上) ものも 13 種中 6 種あるが, 5 種の化合物が中程度 (MIC 32 ~ 64 μg/mL), また 2 種の化合物が強い抗菌作用 (MIC 8~16 μg/mL) を 示し, 置換基やその位置による影響が見られた. *E. faecalis* に対する作用につい ても, 同様の傾向が見られた.

3) イソフラバン類およびイソフラバノン類: *E. faecium* および *E. faecalis* のいず れに対しても中程度 (6 種中 3 種が MIC 32~64 µg/mL) ないし強い抗菌作用 (6 種中 3 種が MIC 8~16 µg/mL) が見られた.

4) 3-アリルクマリン類, プテロカルパン類, クメスタン類: E. faecium に対しては
9種中2種の化合物はほとんど抗菌作用を示さなかった (MIC 128 μg/mL または
それ以上)が,他の7種については中程度 (4種が MIC 32~64 μg/mL) または強い抗菌作用 (3種が MIC 16 μg/mL) を示した.また, E. faecalis に対しては9種中
3種の化合物はほとんど抗菌作用を示さなかった (MIC 128 μg/mL またはそれ以上)が,他の6種については中程度 (4種が MIC 32~64 μg/mL) または強い抗菌
作用 (2種が MIC 16 μg/mL) を示した.

5) 2-アリルベンゾフラン類: *E. faecium* および *E. faecalis* のいずれに対しても中程度 (5 種中 3 種が MIC 32~64 µg/mL) ないし強い抗菌作用 (2 種が MIC 8~16 µg/mL) が見られた.

6) その他:本研究で対象としたベンジルフェニルケトンおよび単純フェノール カルボン酸について抗菌作用はほとんど見られなかった (MIC 128 μg/mL また はそれ以上).

これらのうち 1)~5) については、さらに詳細に化学構造のタイプ別にその置換基による抗菌作用の強弱の差異を示すこととする.

化合物 1~3 はフラボノール類で, 化合物 1 および 2 の構造には kaempferol が 含まれるが, これらには抗菌作用は見られなかった. これに対し, 同じく kaempferol を構造内に有する化合物 3 では, 1 つのプレニル基 (γ,γ-dimethylallyl 基) が導入されており, それによる *E. faecalis* に対する抗菌作用の出現が見られ. これらから今回の甘草から単離したフラボノール類は全体に抗菌活性は高くな いが, プレニル基の導入による抗菌作用の出現が明らかになった.

化合物 4~6 はフラバノン類で化合物 4 および 5 はその配糖体である. これらの中では,化合物 5 が弱いながらも *E. faecalis* に対する抗菌効果を示した.分子内に糖が存在することは抗菌効果を低下させる要因になる可能性も考えられるが,化合物 6 については配糖体構造を有していないにも関わらず,化合物 4,5 と比較した場合の抗菌作用の増強は見られなかった.この場合,プレニル基を有していないことが抗菌作用を示さない要因かもしれない. これらをまとめるとフラバノン類の配糖体および非配糖体については抗菌効果がほとんど見られなかった.

化合物 7 はカルコン類であり、これについてはいずれの菌株に対しても MIC が 128 μg/mL を超え、抗菌効果が認められなかった.

このように、本研究で得た化合物のうち,フラボノール類、フラバノン類、お よびカルコン類は、全体に抗菌活性は弱いかまたはほとんどなく、フラボノー ル類の中では、プレニル基の導入による抗菌作用の出現が見られた.

イソフラボン類については、プレニル基を有し、かつフェノール性水酸基を 複数持つことが、抗菌効果の上で、重要な要素と考えられる. 化合物 8 について はフェノール性水酸基を複数持っているが、 プレニル基を持たず、*E. faecium* に 対する抗菌効果は MIC が 128 μg/mL を超え抗菌効果が認められなかった. *E. faecalis* に対する抗菌効果も MIC が 128 μg/mL であり、抗菌活性は高くなかった. 化合物 9 の場合も、フェノール性水酸基が 1 つしかなく、また、プレニル基も持 たず、 MIC が 128 μg/mL を超え、抗菌効果が認められなかった. 化合物 10 およ び 12 の場合は、両者の構造を比較すると 5 位の水酸基とメトキシ基の違いがあ る. この両者のうち化合物 10 については、フェノール性水酸基を 3 つ持ち、VRE に対する中程度の抗菌作用を示したが、フェノール性水酸基の一つがメトキシ 基となった化合物 12 の抗菌作用はそれよりも弱く、この場合、フェノール性水 酸基のメトキシ基への置換は抗菌作用を低下させる要因となっている. 化合物 11 および14の構造については5位の水酸基とメトキシ基の違いがあり,フェノール性水酸基の数が多い化合物 14 は化合物 11 と比較すると抗菌作用が,より強いことが明らかになった.また,化合物 13 については1 つのプレニル基を有し,かつフェノール性水酸基を4 個有しており,中程度の抗菌作用を示した.化合物 15 および 17 はいずれも2 つのプレニル基を有し,かつフェノール性水酸 基を複数持っており,このような化合物の中に VRE に対する強い抗菌活性を示すものがあることが明らかになった.化合物 16 の場合は,1つのプレニル基とともにフェノール性水酸基2つおよび1つのメトキシ基を持っているが,VRE に対する抗菌作用は強くなかった.しかし全体としてイソフラボン類では,フェノール性水酸基を二つ以上,かつプレニル基を一つ以上持つ化合物では,化合物 18,19 および 20 を除いて,比較的強い抗菌作用を有することを認めた.

イソフラバン類およびイソフラバノン類の場合は C-3 に不斉炭素があり、その結果、B 環の平面が A 環の平面からのずれを生じる. こうした場合、他の構造のフラボノイド類より比較的強い抗菌作用を有することを認めた. 中でも化合物 21 および 22 は、1 つのプレニル基およびフェノール性水酸基を 2 つ以上持ち、これらは *E. faecium* に対する MIC が 32 μ g/mL であり、中程度の抗菌作用を示した. 化合物 23 の場合は、1 つのプレニル基を持つが、フェノール性水酸基がなく、MIC は両菌株に対して 64 μ g/mL であった. また化合物 24, 25, および 26 はいずれもフェノール性水酸基を 3 つ以上および 1 つ以上のプレニル基を持ち、これらについては比較的強い抗菌作用が見られた. 特に化合物 25 については、MIC が 8 μ g/mL であり、検討した化合物中で最も強い抗菌作用を示した.

3-アリルクマリン類ではフェノール性水酸基数が多いもので抗菌作用が強く,中でも化合物 29,30 および 31 については比較的強い抗菌作用が見られた.これに対し,化合物 27,28 ではフェノール性水酸基が 2 つのみであるが,相対的に弱い抗菌作用を示した.

プテロカルパン類に属する化合物 **32** は C-3 および C-4 に不斉炭素を有する が、この場合、プレニル基を持たず、フェノール性水酸基が 1 つだけであり、両 菌株に対して MIC は 32 μg/mL であり、中程度の抗菌作用を示した.

クメスタン類に分類される化合物 33, 34, および 35 では, 3-アリルクマリン類 と比較すると、全体として抗菌作用は弱い傾向が見られた. これには A 環と B 環とが構成する分子の平面性が影響しているかもしれない. 2-アリルベンゾフラン類に分類される化合物 36 については E. faecium に対す る MIC が 8µg/mL, E. faecalis に対する MIC が 16µg/mL であり,比較的強い抗菌 作用を示した.また,化合物 37 および 38 についてはそれらよりやや弱いが中程 度の抗菌作用を示した.化合物 39 および 40 構造については 4'位の水酸基とメトキシ基の違いがあり,4'位にメトキシ基を有する化合物 39 は中程度の抗菌作 用を示したが,フェノール性水酸基を 3 個持つ化合物 40 では相対的に強い抗菌 作用が見られた.

ベンジルフェニルケトンの構造を持つ化合物 41 およびフェノールカルボン酸の化合物 42 では、その抗菌効果は弱かった.

以上の結果に基づき、比較的強い抗菌作用を示した化合物をまとめたものが Fig. 33 である. これらは骨格について見るとイソフラボン、イソフラバン、3-ア リルクマリン、2-アリルベンゾフランのいずれかの構造を有し、さらにこれらの うち抗菌作用が特に強いものでは、いずれもプレニル基を有し、かつフェノー ル性水酸基を複数持っている点が共通の特徴である. このような化合物の中に VRE に対する強い抗菌活性を示すものがあることが明らかになった.



Fig. 33. Licorice phenolics with potent anti-VRE effect.

第4章 主要なフェノール性成分の HPLC による一斉分析の条件の検討

甘草は伝統的な医学で繁用される重要な生薬であるため,生薬の甘草,甘草 配合漢方処方エキス製剤,関連の甘草製品の成分に関する定性・定量分析の検討 については多くの報告がされている.⁵⁵⁻⁶¹⁾甘草には多様なフェノール性成分が 含まれるが,それぞれの成分のエキス中での相対的な抗菌作用への関与や,そ れらをもとにした甘草の抗菌素材としての評価についても検討を進める必要が ある.そこで,主要なフェノール性成分について,高速液体クロマトグラフィー (HPLC)による生薬中の一斉分析の条件を検討し,これを確立することとした.

4-1. 甘草抽出物中のフェノール性成分の HPLC 分析条件の検討

甘草の酢酸エチルエキスについては,第2章で示したように,様々な極性のフ ェノール性成分が共存し,またそれらの中には類似の構造を有するものが少な くない.そこで,これらの HPLC による分析の条件については,逆相系の数種の カラム (C18 系および C8 系カラム)および溶媒の組成について検討し,1回の分 析で少なくとも主要な成分についてはカバーできること,できるだけピーク間 の重なりが小さくなることを目指した.

こうした検討の結果, YMC-Pack Pro C18 (6.0 mm i.d. × 150 mm) (YMC, Kyoto, Japan) をカラムとして使用し, H₂O – CH₃CN – CH₃COOH (55:40:5, v/v/v) を溶 媒として展開することによって, 1 回の分析で 25 種の化合物の分析が可能となった.

この分析においては検出器として diode-array detector (DAD) を使用し, 各ピークの保持時間とともに UV スペクトルをも使用して各ピークに対応する化合物の同定を行った.

Fig. 34 は DAD 検出器で 280 nm をモニタリングの波長として使用し、YMC-Pack Pro C18 をカラムとして使用した場合のクロマトグラムを示しており,各ピ ークはそれぞれ,demethylhomopterocarpan (**32**, t_R 38.6 min), 7-O-methylluteone (**14**, t_R 41.2 min), licopyranocoumarin (**27**, t_R 46.0 min), glycybenzofuran (**38**, t_R 46.6 min), glycyrol (**33**, t_R 52.9 min), licoarylcoumarin (**29**, t_R 68.0 min), licoriphenone (**41**, t_R 73.2 min), glycyrin (**30**, t_R 79.4 min), glycycoumarin (**31**, t_R 85.9 min), glicoricone (**19**, t_R 91.8 min), neoglycybenzofuran (**40**, t_R 98.1 min), glycyrrhiziisofavone B (**12** t_R 102.4 min), glyasperin D (**21**, t_R 107.4 min), gancaonin G (**16**, t_R 112.1 min), glyasperin C (**24**, t_R 121.0 min), 8-(γ , γ -dimethylallyl)-wighteone (**15**, t_R 141.1 min), licoricidin (**25**, t_R 147.9min), 4'-O-methylglycybenzofuran (**39**, t_R 156.1 min), glyasperin J (**22**, t_R 164.5 min), glycyrrhizisofavone (**13**, t_R 202.9 min), 3'-(γ , γ -dimethylallyl)-kievitone (**26**, t_R 213.5 min), glyasperin J trimethyl ether (**23**, t_R 222.8 min), isoangustone A (**17**, t_R 233.2 min) ic L 3 b O であることを確かめた.



Fig. 34. HPLC Pro file of phenolic constituents from the ethyl acetate extract of Tohoku licorice.

^{*a*}Column, YMC-Pack Pro C18 (6.0 mm i.d. ×150); mobile phase, H₂O–CH₃CN– CH₃COOH (55:40:5, v/v/v); flow rate, 1.0 mL/min; oven temperature, 40°C. ^{*b*}The peak numbers shown are corresponding to the compound numbers (see text).

それぞれの化合物の DAD 検出器による UV スペクトルは Fig. 35 に示す通り で,保持時間および UV スペクトルによって,各ピークの同定を行うことができた.

これらのうち, Fig. 34 に示す各成分のうち, 主要なピークとして認められた glycyrol (**33**), gancaonin I (**36**), isoangustone A (**17**), glycyrin (**30**), glycycoumarin (**31**), glicoricone (**19**), 6,8-diprenylorobol (**18**), 及び licoriphenone (**9**) の 8 種の化合物に ついては, 4-3 節に示すようにこの HPLC 条件を用いて定量分析をも行った.



Fig. 35. Reversed-phase HPLC-DAD pofile of EtOAc extract of licorice.
4-2. 甘草の主要なフェノール性成分の LC-MS 分析

さらに,以下に示す条件で LC-MS をも使用して,それら各成分のエキス中の 存在について確認を行った.

/	Pump: Shimadzu LC-20A (Shimadzu)	
	MS: amaZon X and ETD (Bruker) equipped with with an ESI inter-face	
	Ion mode: Positive	
	Gapillary: - 4500 v	
	Column: YMC Triart C18 (2.0 mm i.d. ×100 mm) (YMC)	
	Temperature: 40 °C	
	Mobile phase:	
	solvent A: $H_2O - CH_3CN - HCOOH (70: 30: 1\%, v/v/v)$	
	solvent B: $H_2O - CH_3CN - HCOOH (50 : 50 : 1\%, v/v/v)$	
	Gradient condition:	
	$0-15 \min$, 5% solvent B;	
	15-30 min, 5%-30% solvent B;	
	30-60 min, 30%-100% solvent B;	
	60-70 min, 100%-50% solvent B in 1%-50% solvent A;	
	70-75 min, finally, reconditioning the column with 100%	
$\overline{\ }$	solvent A isocratic for 5 min at the flow rat;	

この条件での分析の結果, Fig. 36 に示すような HPLC プロファイルが得られ, ピーク間の良好な分離が可能であった (Fig. 36).

主要な HPLC ピークに対応する化合物 12 種についての ESI-MS データを Fig. 37 に示す. liquiritin (5, t_R 13.3 min, peak a in Fig. 37, MW 418), licoricone (20, t_R 20.2 min, peak b, MW 382), gancaonin G (16, t_R 24.8 min, peak c, MW 354), demethylglycyrol (35, t_R 26.7 min, peak d, MW 352), glycyrol (33, t_R 27.1 min, peak e, MW 366), isolicoflavonol (3, t_R 27.6 min, peak f, MW 354), glycycoumarin (31, t_R 28.5 min, peak g, MW 368), glycyrin (30, t_R 29.1 min, peak h, MW 382), glyasperin D (21, t_R 31.5 min, peak i, MW 370), gancaonin I (36, t_R 32.4 min, peak j, MW 354), licoarylcoumarin (29, t_R 33.6 min, peak k, MW 366), isoangustone A (17, t_R 35.1 min, peak l, MW 422) によるものであることを確かめることができた.



Fig. 36. Total ion chromatogram of phenolic constituents from the ethyl acetate extract of Tohoku licorice.

^{*a*}Column, YMC-Triart C₁₈ (2.0 mm I.D. × 100 mm) (YMC); Solvent A, H₂O-CH₃CN-HCOOH (70 : 30 : 1, v/v/v); ^{*b*}Solvent B, H₂O-CH₃CN-COOH (50 : 50 : 1, v/v/v); Flow rate, 0.20 mL/min; Oven temperature, 40°C.

^{*a*}The peak numbers shown are corresponding to the compound numbers (see text). ^{*b*}Gradient profile:

0-15 min, 5% solvent B;

15-30 min, 5%-30% solvent B;

30-60 min, 30%-100% solvent B;

60-70 min, 100% - 50% solvent B in 1% - 50% solvent A;

70-75 min, finally, reconditioning the column with 100% solvent A isocratic for 5 min at the flow rat;



Fig. 37. ESI-MS data for major phenolic compounds shown by HPLC peaks in Fig. 36. a) liquiritin (5, t_R 13.3 min); b) licoricone (20, t_R 20.2 min); c) gancaonin G (16, t_R 24.8 min); d) demethylglycyrol (35, t_R 26.7 min); e) glycyrol (33, t_R 27.1 min); f) isolicoflavonol (3, t_R 27.6 min); g) glycycoumarin (31, t_R 28.5 min); h) glycyrin (30, t_R 29.1 min); i) glyasperin D (21, t_R 31.5 min); j) gancaonin I (36, t_R 32.4 min); k) licoarylcoumarin (29, t_R 33.6 min); l) isoangustone A (17, t_R 35.1 min) (1). (Continued)



Fig. 37. ESI-MS data for major phenolic compounds shown by HPLC peaks in Fig. 36. a) liquiritin (5, t_R 13.3 min); b) licoricone (20, t_R 20.2 min); c) gancaonin G (16, t_R 24.8 min); d) demethylglycyrol (35, t_R 26.7 min); e) glycyrol (33, t_R 27.1 min); f) isolicoflavonol (3, t_R 27.6 min); g) glycycoumarin (31, t_R 28.5 min); h) glycyrin (30, t_R 29.1 min); i) glyasperin D (21, t_R 31.5 min); j) gancaonin I (36, t_R 32.4 min); k) licoarylcoumarin (29, t_R 33.6 min); l) isoangustone A (17, t_R 35.1 min) (2). (Continued)



Fig. 37. ESI-MS data for major phenolic compounds shown by HPLC peaks in Fig. 36. a) liquiritin (5, t_R 13.3 min); b) licoricone (20, t_R 20.2 min); c) gancaonin G (16, t_R 24.8 min); d) demethylglycyrol (35, t_R 26.7 min); e) glycyrol (33, t_R 27.1 min); f) isolicoflavonol (3, t_R 27.6 min); g) glycycoumarin (31, t_R 28.5 min); h) glycyrin (30, t_R 29.1 min); i) glyasperin D (21, t_R 31.5 min); j) gancaonin I (36, t_R 32.4 min); k) licoarylcoumarin (29, t_R 33.6 min); l) isoangustone A (17, t_R 35.1 min) (3).

4-3. 主要なフェノール性成分の定量分析

甘草の酢酸エチル粉末から調製した試料の HPLC 分析によって得られるクロ マトグラムにおいて,明瞭なピークを示した以下の8種の成分については,各ピ ークの面積から,絶対検量線法によって含量を求めた.

その結果,東北甘草酢酸エチルエキス中の主要な各フェノール性成分含量について Table 9 に示す結果を得た.

Table 9. Contents of major licorice phenolics in the ethyl acetate extract from Tohoku liricoce.

Compound	Content (%)
glycyrol (33)	0.54
gancaonin I (36)	0.49
isoangustone A (17)	0.34
glycyrin (30)	0.26
glycycoumarin (31)	0.24
glicoricone (19)	0.18
6,8-diprenylorobol (18)	0.09
licoriphenone (9)	0.08

Table9に示すように,これらのうち比較的抗菌作用の強い化合物 glycyrin (**30**), glycycoumarin (**31**), gancaonin I (**36**) などは比較的多量含まれており,これらは, 甘草が示す抗菌作用,特に VRE に対して示すその作用において,重要であるこ とが認められた.

4-4. 甘草のフェノール性成分の構造上の特徴

本研究で見出した甘草の構造上特徴的なフェノール性成分については以下のようにまとめられる.

甘草には、カルコン、フラバノン、フラバノン、イソフラボン、イソフラバン、 3-アリルクマリン等の種々の骨格のフラボノイド関連成分が多様な置換様式で 含まれている.今研究によって新規化合物イソフラボンとして 5,7-di-Omethylluteone (11)、新規クメスタンとして dimethylglycyrol (35)をそれぞれ見出す ことができた.また、中でも新規化合物のうち2種の 4'-Omethylglycybenzofuran (39) および neoglycybenzofuran (40) は2-アリルベンゾフ ラン骨格を有するが、これらはいずれも3位にメチル基を有する点が特徴的で ある.こうした構造の化合物はglycybenzofuran (38) とともに、甘草からのみ見 出されたものであり、珍しい化合物群であると言える.本研究によって、こうし た2-aryl-3-methylbenzofuran 構造を有する特異な構造を持つ化合物群が甘草中に 複数存在していることが明らかになった.

これらおよび demethylhomopterocarpan (**32**), glyasperin J (**22**), glyasperin J trimethyl ether (**23**) については, 微量成分ではあったが単離することができた (Fig. 38).



Fig. 38. Structures of licorice trace components.

また,化合物 41 については,単純な構造の化合物ではあるが,これまでに甘 草からの単離の報告はなく,他の成分の変化によって生じた可能性も考えられ るが,これについて今後,他の種類の甘草についても比較しながら検討する必 要があると思われる.

総括

中国や東南アジア各国など東アジア地域には多くの未利用植物資源があり, その中には医薬品開発のリードなる可能性のある成分も期待される.中でも生 薬として伝統医学や民族医学で繁用される甘草については,サポニンとともに フェノール性成分が,その新たな生物活性が見出され,その重要性が近年,明ら かにされつつある.

本研究では甘草の抗菌作用物質としてのフェノール性成分に着目し, 第1章 で示したように東北甘草の酢酸エチル粗抽出物には強い抗 VRE 作用を見出した ことから、第2章で示したようにその分画精製を進め、その結果、新規化合物4 種を含む 43 種の化合物を単離し、その構造的多様性を確認することができた。 本研究で単離したフェノール性成分について見ると, フラボノールやフラバノ ンなどの多くの植物から見出される通常のフラボノイドに加えて、イソフラボ ン,イソフラバン,イソフラバノンなどマメ科植物などに限定的に分布する骨 格のフラボノイドも数多く含まれている. さらに甘草には 3-アリルクマリンや, クメスタン、プテロカルパン、2-アリルベンゾフランなどの多様な骨格の成分が 共存することも含まれることを、本研究においても確かめることができた. 中 でも、2-アリルベンゾフラン骨格を有する化合物の天然からの単離例は少なく、 特に3位にメチル基を有する2-aryl-3-methylbenzofuran については、これまでに 甘草から1種のみ報告があるだけで、本研究で2種のこの骨格を持つ新規化合 物の4'-O-methylglycybezofuran (39) および neoglycybenzofuran (40) を甘草から見 出したことによって、甘草の成分の特異性がさらに明らかになったものと思わ れる (Fig. 39).



Fig. 39. Structures of 2-aryl-3-methylbenzofuran.

これら 2 種の化合物はいずれもレトロフラボノイドと呼ばれる酸素官能基の 置換様式を有していたが、本研究も含めてこれまでに甘草から得られている 3 種の 2-aryl-3-methylbenzofuran がすべてレトロフラボノイドタイプの置換様式を 有することは、この骨格の生合成的な検討に際して考慮すべきものと思われる.

本研究で構造決定した新規化合物のうち、5,7-di-O-methylluteone (11) はプレニ ル基を有する典型的なイソフラボンの構造であるが、dimethylglycyrol (35) はク メスタン骨格を有しており、この骨格は 3-アリルクマリンの 4 位への B 環の水 酸基の求核反応によって生成するものとみなすことができ、glycycoumarin (31) から glycyrol (33) へ直接形成する可能性も考えられるが、glycycoumarin (31) の 前駆体に相当するそのデメチル体 (47) から demethylglycyrol (35) が形成され、 そのメチル化によって glycyrol (33) が形成されるとすれば、demethylglycyrol (35) はプレニル基を有するクメスタン類の生合成上、キーとなる化合物と考えうる (Fig. 40). 最近、甘草の成分間の生合成的な関係について検討が進められ、 glycyrol (33) の生合成についてこの経路を支持する報告が出されている.⁶⁷⁾



Fig. 40. Biogenesis of coumestans.

第3章では、多くの抗菌剤に耐性を示す VRE に対し、東北甘草から単離した フェノール性成分42種の作用について検討した結果を示した.本研究で VRE に 対する作用を検討した化合物のうち、比較的強い抗菌作用を示す化合物は、8-(γ,γ-dimethylallyl)-wighteone (15), isoangustone A (17), glyasperin C (24), licoricidin (25), 3'-(γ,γ-dimethylallyl)-kievitone (26), glycyrin (30), glycycoumarin (31), gancaonin I (36), licocoumarone (37)であった.

特に甘草のフェノール性成分の多くはプレニル基を有することが特徴的であ り、このプレニル基の存在が、フェノール性水酸基とともに、その抗菌作用上、 重要な要因と考えられる.こうしたプレニルフラボノイドについては、マメ科 植物のほか、クワ科植物などにも見られるが、プレニル基を有するイソフラボ ンやその他の骨格の化合物が多種共存する点で、甘草はユニークなフェノール 性成分ないしフラボノイドの組成を持っており、本研究で見出した化合物群の 抗 VRE 作用を含めて、今後、種々の生物活性への応用が期待される.

甘草酢酸エチル抽出物中におけるフェノール性成分の寄与を明確にし、抗菌 作用物質開発の素材としての甘草についての評価を実施するために、主要なフ ェノール性成分の HPLC による一斉分析の条件を検討し、そのプロファイルを 作成した. 逆相系の HPLC 条件で, diode-array detector (DAD) による UV スペク トル、さらに LC-MS をも使用して各ピークの同定を行った甘草の主要なフェノ ール性成分分の一斉分析の条件を確立した.

さらに、単離した化合物中の 8 種の化合物については、定量分析をも行い、 これらのうち比較的抗菌作用の強い化合物 glycyrin (30)、glycycoumarin (31)、 gancaonin I (36) などを中心に、抗菌作用物質が全体として多量含まれており、 これらは、甘草のエキスが VRE に対して示す抗菌作用への寄与の面からも重要 であることが明らかになった.

こうした分析条件の確立は、抗菌素材としてだけでなく、甘草が示す抗炎症作用、抗潰瘍作用、抗 HIV 作用などの検討においても重要であると考えられ、また他のマメ科植物由来等の品質評価に応用できる可能性を持ったものと考えられる.

79

実験の部

実験の部

旋光度は JASCO DIP-1000 型旋光度, LC/MS/MS スペクトルは AP14000 でそれ ぞれ測定した.¹H NMR スペクトルは Varian INOVA-AS600 (¹H NMR: 600MHz, ¹³C NMR: 150 MHz) を用い,溶媒シグナルを TMS 標準 δ_{H} : 2.04 (¹H) δ_{C} : 29.8 (¹³C) [acetone- d_{6}] δ_{H} : 3.30 (¹H) δ_{C} : 49.0 (¹³C) [CD₃OD], δ_{H} : 2.49 (¹H) δ_{C} : 39.7 (¹³C) [DMSO- d_{6}] に設定して測定した. ケミカルシフトは δ (ppm) 値で示した.

質量分析は, ESI-MS

MS: amaZon X and ETD (Bruker) を negative もしくは positive mode で用いた. Direct injection を用いる場合の分析条件は以下のとおりである. Mobile phase: H₂O: CH₃CN: HCOOH = 50: 50: 1 (v/v/v)

高分解能質量分析は以下の条件で実施した.

JMS-700 MStarion (JEOL)

測定モード: FAB⁺

校正物質: PEG-400

マトリックス: YOKUDEL-FAB-Matrix (JAOL) (ジチオスレイトール:*m*-ニトロ ベンジルアルコール = 1:1の混合物).

化合物の精製過程では, HPLC は以下に示す条件で分析を行った.

Column: YMC-Pack SIL A-302 (4.6 mm i.d. \times 150 mm) (YMC Co, LTD) Temperature: 40 °C Flow Rate: 1.0 mL/min Wavelength: 280 nm Mobile Phase (R1) H₂O : CH₃CN : CH₃COOH = 50 : 45 : 5 (R2) H₂O : CH₃CN : CH₃COOH = 70 : 27 : 3

また, 分取 (Preparative) HPLC は以下の条件で行った. Column: YMC-Pack A-324 (2.0 mm i.d. \times 300 mm) (YMC Co, LTD) YMC-Pack A-323 (2.0 mm i.d. \times 300 mm) (YMC Co, LTD) Pump: LC-6A (Shimadzu), LC-10AD (Shimadzu), L-7110 (Hitachi) Detector: SPD-6A (Shimadzu) [280 nm, 250 nm] Temperature: 40 °C Flow Rate: 2.0 mL/min, 2.5 mL/min, 3.0 mL/min Mobile Phase (R3) H₂O : CH₃CN : CH₃COOH = 55 : 40 : 5 (R4) H₂O : CH₃CN : CH₃COOH = 60 : 35 : 5

分取 TLC は以下の条件で行った.

Plate: Pre-coated TLC plates Silica F254 gel 20×20 cm Mobile Phase: A: CHCl₃ : MeOH = 15 : 1

B: CHCl₃ : MeOH = 9 : 1

カラムクロマトグラフィーは TOYOPERAL HW-40C (TOSOH), MCI-gel CHP-20P (三菱化成), Silica gel (YMC), YMC-gel ODS-A (S, 75 µm) (YMC), Sep-Pak C18 (Waters, Milford, USA) を試料の脱塩, 精製に用いた. また Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Buckinghameshire, UK) を充填剤として用いた.

溶媒の除去はすべて 40 ℃ 以下でロータリーエバポレーターまたは凍結乾燥 を用いて行った.

第1章 東北甘草とそのエキスの VRE に対する抗菌作用に関する実験

各種甘草についてエキスの VRE に対する効果の予備的検討のため, 試料を以下のようにして調製した.

1. 材料

東北甘草 (栃本天海堂, Lot. No. 002011011), 炙甘草 (栃本天海堂, Lot. No. 002013003), 蜜炙甘草 (栃本天海堂, Lot. No. 002012008) は国内市場品を購入して使用した. また, 自家加熱処理東北甘草は, 鍋で3分程度加熱し調製した.

2. 各種甘草からのエキスの調製

各種甘草それぞれ 50 g について粉砕機で破砕し, 酢酸エチルおよびメタノー ルで一夜冷浸して各エキスを得た. この 4 種の甘草について得た酢酸エチルエ キスおよびメタノールエキスについて VRE に対する作用の検討を行った.

第2章 甘草の抽出,単離及び精製

抽出材料

本章の実験で使用した甘草は東北甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) で,日本 薬局方適合医療用生薬として,栃本天海堂 (Lot. No. 002011011) から購入した ものを使用した.この試料 [GU-07112011 (NEL)] は,岡山大学大学院医歯薬学 総合研究科薬用植物園に保管している.

甘草からのフラボノイドの単離(1)

東北甘草について粉砕機で破砕し, n-ヘキサン 6 L で一夜冷浸し, 脱脂後, 酢酸エチルで同様に 3 回, 計 6 L で抽出を行い, 溶媒を留去して n-ヘキサン (4.58 g), 酢酸エチル (46.37 g) を得た. この酢酸エチル抽出物 (5.02 g) について CHCl₃-MeOH-H₂O (7:13:8, v/v/v) を使用して向流分配操作 (n=4, r=4) を行い, 8 フラクションを得, 極性の低いほうから順に下層 1 (3.9 g), 下層 2 (0.53 g), 下層 3 (0.10 g), 下層 4 (68.8mg), 上層 4 (50.4 mg), 上層 3 (58.8 mg), 上層 2 (71.3 mg), 上層 1 (51.1 mg) とした.

このうち下層 1 (3.9 g) についてシリカゲル (3.0 cm i.d. × 30 cm) カラムクロ マトグラフィーを行い, CHCl₃-MeOH (95:5, v/v, 5%→10%→15%→20%→25%→ 30%→35%→40%→45%→50%→60%→65%→70%→80%→90%→100% MeOH→ 70% acetone) で順次溶出し Fr. 1-58 を得た. その Fr. 10-13 (470 mg) についてさ らに ODS-gel (1.1 i.d. × 42 cm) カラムクロマトグラフィーを行い, H₂O→5%→10%→15%→20%→25%→30%→35%→40%→45%→50%→60%→65% →70%→80%→90%→100% MeOH→70% acetone で順次溶出して分画精製した. その 30% MeOH 溶出部について MCI-gel CHP-20P (1.1 cm i.d. × 40 cm) カラムク ロマトグラフィーを行って, allolicoisoflavone B (8) (4.5 mg), licoricidin (25) (10.2 mg) および 3'-(γ , γ -dimethyl- allyl)-kievitone (26) (3.4 mg) を得た. さらに ODS-gel カラムクロマトの 25% MeOH 溶出部 Fr. 1-40 (43 mg) について分取 TLC [CHCl₃ - MeOH, 9:1 (v/v)] を行って, isolicoflavonol (3) (3.07 mg), isoglycycoumarin (28) (2.5 mg), および licoarylcoumarin (29) (5.8 mg) を得た. また下層 2 (0.53 g) についても同様の方法で分画を行った. シリカゲルカラム クロマトの Fr. 7-10 (180 mg) についてさらに ODS-gel (1.1cm i.d. ×42 cm) カラム クロマトグラフィーを行い, CHCl₃ – MeOH (95 : 5, v/v, 5%→10%→15%→20%→ 25%→30%→35%→40%→45%→50%→60%→65%→70%→80%→90%→100% MeOH→70% acetone) で順次溶出して分画精製した. その 20% MeOH 溶出部 Fr. 1-100 (66 mg) を MCI-gel CHP-20P (1.1 cm i.d. × 40 cm) カラムクロマトグラフィ ーを行って精製し, 30% MeOH 溶出部から 7-*O*-methylluteone (14) (1.92 mg), kaempferol-3-*O*-methyl ether (1) (3.1 mg) および kaempferol (2) (6.78 mg) を得た. さらに ODS-gel カラムクロマトの 25% MeOH 溶出部 Fr. 1-40 (20 mg) について 分取 TLC [CHCl₃ – MeOH, 9:1 (v/v)] を行い, formononetin (9) (1.3 mg) を得た. ま た, ODS-gel カラムクロマトの 30% MeOH 溶出部 Fr. 1-80 (10 mg) について分取 HPLC により精製し 6"-*O*-acetylliquiritin (4) (3.8 mg) を単離した.

甘草からのフラボノイドの単離(2)

上述の方法によって化合物間の各種カラムクロマト担体上での溶出挙動が判 明したため, 甘草の酢酸エチルエキス (40 g) について, 別途, ODS-gelを主とし て使用した分離を実施した. ODS-gel (2.2 cm i.d. × 75 cm) カラムクロマトグラフ ィーを行い、CHCl₃ – MeOH (5% \rightarrow 10% \rightarrow 15% \rightarrow 20% \rightarrow 25% \rightarrow 30% \rightarrow 35% \rightarrow 40% \rightarrow 45%→50%→60%→65%→70%→80%→90%→100% MeOH)→70% acetoneで順次 溶出した. これらのうちCHCl₃-MeOH (55:45, v/v) 溶出部についてさらにMCIgel CHP-20P (2.2 cm i.d. × 45 cm) クロマトを行い、その15% MeOH溶出部 Fr. 12-45 (86 mg) についてHPLC分取により精製しliquiritin (5) (8.33 mg) を得た. また MCI-gelカラムクロマトの30% MeOH溶出部Fr. 30-50について分取TLC [CHCl3-MeOH, 9:1 (v/v)] を行って semilicoisoflavone B (10) (2.0 mg), および phydroxybenzoic acid (42) (6.88 mg) を得た. さらにODS-gelクロマトのCHCl3-MeOH (50: 50, v/v) 溶出部3.6 gについてMCI-gel CHP-20P (2.2 cm i.d. × 45 cm) カ ラムクロマトグラフィーを行い, 10% MeOH溶出部のFr. 85 (48 mg), Fr. 94 (42 mg), Fr. 96 (40 mg)について分取HPLCにより精製し, glycyrol (33) (4.1 mg), glycyrin (30) (15.44 mg) (Fr. 85から), 5,7-di-O-methylluteone (11) (3.45 mg), gancaonin I (36) (5.88 mg), isoglycyrol (34) (4.2 mg), および glyasperin J trimethyl ether (23) (1.5 mg) (Fr. 94

から), liquiritigenin (6) (8.5 mg), gancaonin G (16) (3.1 mg), 3-(*p*-hydroxyphenyl)-7methoxycoumarin (43) (1.22 mg), 6,8-diprenylorobol (18) (4.22 mg), glyasperin J (22) (2.3 mg), 4-O-methylglycybenzofuran (39) (3.2 mg), licoriphenone (41) (1.9 mg), およ びisoangustone A (17) (4.5 mg) (Fr. 96から) を得た. また, MCI-gelクロマトの30% MeOH溶出部のFr. 137 (22 mg), Fr. 161 (28 mg) について分取HPLCにより精製し, isoliquiritin (7) (2.3 mg) および8-(γ , γ -dimethyallyl)-wighteone (15) (1.9 mg) (Fr. 137 から), demethylhomopterocarpan (32) (1.2 mg) (Fr. 161から) を得た. さらに, MCIgelクロマトの50% MeOH溶出部Fr. 230 (31 mg), 231 (30 mg), 234 (28 mg), Fr. 236-237 (40 mg), 337 (22 mg), Fr-343-347 (59 mg) について分取HPLCにより精製し, glycyrrhisofavone (13) (5.0 mg) (Fr. 230 から), licopyranocoumarin (27) (4.9 mg), glyasperin C (24) (3.0 mg), およびneoglycybenzofuran (40) (2.0mg) (Fr. 231から), glycyrrhia isofavone B (12) (1.6 mg) (Fr. 234から), demethlglycyrol (35) (1.75 mg) お よびglicoricone (19) (3.86 mg) (Fr. 236-237から), glycybenzofuran (38) (1.8 mg) (Fr. 327から), glycycoumarin (31) (5.3 mg), licocoumarone (37) (7.93 mg), licoricone (20) (2.11 mg), およびglyasperin D (21) (3.5 mg) (Fr. 343-347から) を得た.

Kaempferol-3-O-methlether (1)

淡黄色針状晶 mp 272 °C (文献値, mp 271 °C)¹⁶⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 210 (4.48), 267 (4.19), 345 (4.19). ESI-MS *m*/*z* 301 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone*d*₆) δ_{H} : 4.10 (3H, s, -OCH₃) 5.98 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 6.28 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 7.01 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3',5'), 8.14 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2',6'), 12.80 (1H, s, 5-OH).

Kaempferol (2)

黄色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 266 (4.08), 365 (3.69). ESI-MS *m/z* 301 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 6.26 (1H, br s, H-6), 6.68 (1H, br s, H-8) 7.01 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3',5'), 8.14 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2',6').

Isolicoflavonol (3)

淡黄色針状晶 mp 119 °C (文献値, mp 119 °C)³⁸⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 210 (4.45), 252 (4.29), 370 (4.40). ESI-MS *m*/*z*: 355 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone*d*₆) $\delta_{\rm H}$: 1.73, 1.74 (each 3H, br s, CH₃), 3.40 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1"), 5.38 (1H, t, *J* = 9 Hz, H-2"), 6.24 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 6.48 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 7.00 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.97 (1H, dd, *J* = 1.8, 9.0 Hz, H-6'), 8.05 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 12.17 (1H, s, 5-OH).

6"-O-Acetylliquiritin (4)

 H-5).

Liquiritin (5)

無色針状晶 mp 213 °C (文献値, mp 211-212 °C)¹⁹⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 213 (4.48), 219 (4.16), 311 (3.76). ESI-MS *m*/*z* 418 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone*d*₆) δ_{H} : 2.73 (1H, dd, *J* = 3.0, 16.8 Hz, H-3a), 3.04 (1H, dd, *J* = 12.6, 16.8 Hz, H-2b), 3.40-3.53 (4H, m, glc-2, 3, 4, 5), 3.73 (1H, dd, *J* = 5.4, 12.0 Hz, glc-6), 3.85 (1H, dd, *J* = 1.8, 12.0 Hz, glc-6), 4.97 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, glc-1), 5.47 (1H, dd, *J* = 3.0, 12.6 Hz, H-2), 6.37 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 6.54 (2H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-6), 7.12 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3', 5'), 7.45 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2', 6'), 7.68 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5).

Liquiritigenin (6)

無色針状晶 mp 207 °C (文献値, mp 207 °C)¹⁹⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 213 (4.04), 231 (4.16), 311 (3.96). ESI-MS *m*/*z* 256 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 2.67 (1H, dd, *J* = 3.0, 19.8 Hz, H-3a), 3.03 (1H, dd, *J* = 12.6, 19.8 Hz, H-3b), 5.4 (1H, dd, *J* = 3.6, 15.6 Hz, H-2), 6.37 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 6.54 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, H-6), 6.84 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3', H-5'), 7.34 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-2', H-6'), 7.68 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5).

Isoliquiritin (7)

無色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 207 (4.48), 229 (4.19), 360 (4.56). ESI-MS *m/z* 418 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 3.40–3.62 (4H, m, glc-2, 3, 4, 5), 3.68 (1H, dd, *J* = 5.0, 12.0 Hz, glc-6), 3.87 (1H, dd, *J* = 2.0, 12.0 Hz, glc-6), 5.03 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, glc-1), 6.33 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 6.45 (H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 7.14 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3, 5), 7.75 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2, 6), 7.78 (2H, s, H- α , β), 8.08 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-6').

Allolicoisoflavone B (8)

淡黄色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 216 (4.95), 272 (4.19), 370 (4.15). ESI-MS *m*/*z* 353 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.43 (6H, br s, -CH₃), 5.76 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-4'), 6.27 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 6.41 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-8), 6.82 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-7'), 6.90 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5'), 7.00 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8'), 8.15 (1H, dr s, H-2).

Formononetin (9)

黄色針状晶 mp 260 °C (文献値, mp 259 °C)⁶⁵⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 230 (4.45), 252 (4.29). ESI-MS *m*/*z* 269 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 3.82 (3H, s, OCH₃), 6.88(1H, dd, *J* = 1.8 Hz, H-8), 6.97 (1H, br d, *J* = 2.4, 9 Hz, H-3',5'), 7.5 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2',6'), 8.04 (1H, d, *J* = 9 Hz, H-5), 8.14 (1H, br s, H-2).

Semilicoisoflavone B (10)

無色針状晶 mp 130 °C (文献値, mp 131 °C)²³⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 228 (4.43), 274 (4.16), 284 (4.24). ESI-MS *m*/*z* 353 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.69 (6H, br s, -CH₃), 5.45 (1H, d, *J* =10.0 Hz, H-8'), 6.26, 6.40 (1H, each, dr s, H-6, 8), 6.40 (1H, d, *J* = 12 Hz, H-7'), 6.89, 7.00 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'6'), 8.09 (1H, br s, H-2), 13.05 (1H, s, 5-OH).

5,7-Di-O-methylluteone (11)

淡黄色微結晶性粉末 mp 265 °C; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 210 (4.47), 259 (4.45), 345 (4.23). ESI-MS *m*/*z* 383 [M+H]⁺. HR-FAB-MS m/z 383.1448 [M+H]⁺ (Calcd for C₂₂H₂₃O₆, 383.1495). ¹HNMR (600 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 1.60, 1.69 (3H, br s, CH₃), 3.21 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 3.40 (3H, s, -OCH₃), 3.76 (3H, s, -OCH₃), 5.14 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.38 (1H, br s, H-8), 6.91 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-3'), 6.99 (1H, dd, *J* = 1.2, 8.4 Hz, H-5'), 7.97 (1H, br s, H-2), 8.02 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

¹³C NMR 151 MHz CD₃OD δ_{C} : 170.1 (C-2), 119.8 (C-3), 178.8 (C-4), 106.5 (C-4a), 159.2 (C-5), 115.6 (C-6), 160.4 (C-7), 96.4 (C-8), 156.7 (C-8a), 117.5 (C-1'), 160.0 (C-2'), 103.3 (C-3'), 157.1 (C-4'), 116.8 (C-5'), 128.2 (C-6'), 23.5 (C-1"), 125.2 (C-2"), 130.9 (C-3"), 17.7 (C-4"), 25.7 (C-5"), 55.9 (-OCH₃), 61.3 (-OCH₃).

Glycyrrhizaisofavone B (12)

無色針状結晶 mp 198 °C (文献値, mp 197 °C)³⁷⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 210 (4.48), 258 (4.39). ESI-MS *m*/*z* 367 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.38 (6H, br s, -CH₃), 3.76 (3H, s, -OCH₃), 5.71 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-8'), 6.40 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-7'), 6.44 (2H, s, H-6, 8), 6.78, 6.95 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2', 6'), 7.93 (1H, br s, H-2).

Glycyrrhisofavone (13)

無色針状結晶 mp 222 °C (文献値, mp 224 °C)³⁸⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 208 (4.58), 268 (4.33). ESI-MS *m/z* 356 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.68, 1.71 (3H, br s, -CH₃), 3.33 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 5.24 (1H, t, H-2"), 6.41 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.46 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 6.64 (1H, br s, H-8), 7.22 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 7.91 (1H, br s, H-4).

7-O-Methylluteon (14)

無色立方体結晶 mp 272 °C (文献値, mp 272-273 °C)³⁹⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 209 (4.45), 265 (4.17). ESI-MS *m*/*z* 369 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.67, 1.87 (3H, br s, -CH₃), 3.38 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 3.93 (3H, s, -OCH₃), 5.20 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.47 (1H, dd, *J* = 1.2, 8.4 Hz, H-5'), 6.48 (1H, br s, H-8), 6.55 (1H, d, *J* = 1.2, Hz, H-3'), 7.02 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-6'), 8.09 (1H, br s, H-2).

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 1.68, 1.89 (3H, br s, -CH₃), 3.42 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 3.96 (3H, s, -OCH₃), 5.26 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.48 (1H, br s, H-8), 6.87

(1H, dd, *J* = 1.2, 8.4 Hz, H-5'), 6.95 (1H, d, *J* =1.2, Hz, H-3'), 7.42 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-6'), 8.10 (1H, br s, H-2).

<u>8-(γ , γ -dimethyallyl)-Wighteone (15)</u>

無色針状結晶 mp 142 °C (文献値, mp 142 °C)⁴⁰⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 210 (4.45), 273 (4.32). ESI-MS *m*/*z* 423 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.65 (6H, br s, -CH₃), 1.76, 1.85 (3H, br s, -CH₃), 3.43(1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-1"), 3.52 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 5.21, 5.22 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2", 2"), 6.89 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3', 5'), 7.48 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2', 6'), 8.21 (1H, br s, H-2), 13.33 (1H, s, 5-OH).

Gancaonin G (16)

無色針状結晶 mp 98 °C (文献値, mp 97-100 °C)²⁵⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 230 (4.49), 365 (4.18). ESI-MS *m/z* 355 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.73, 1.64 (3H, br s, CH₃), 3.44 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-1"), 3.98 (3H, s, -OCH₃), 5.20 (1H d, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.67 (1H, br s, H-8), 6.97 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3', 5'), 7.12 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2', 6'), 8.20 (1H, br s, H-2), 13.01 (1H, s, 5-OH).

¹³C NMR (150 MHz, acetone-*d*₆) δ_{C} : 154.6 (C-2), 122.9 (C-3), 180.8 (C-4), 105.7 (C-4a), 157.9 (C-5), 112.1 (C-6), 163.3 (C-7), 90.6 (C-8), 156.3 (C-8a), 121.6 (C-1'), 130.6 (C-2', 6'), 115.5 (C-3', 5'), 158.2 (C-4'), 21.4 (C-1"), 122.3 (C-2"), 131.4 (C-3"), 18.1 (C-4"), 25.8 (C-5"), 56.8 (-OCH₃).

Isoangustone A (17)

無色針状結晶 mp 191 °C (文献値, mp 191-193 °C)⁶⁴⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 211 (4.58), 275 (4.39). ESI-MS *m/z* 423 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.63,1.68, (3H, br s, -CH₃), 1.71, 1.76 (3H, br s, -CH₃), 3.35, 3.44 (2H, d, *J* = 7.6 Hz,, H-9, 7'), 5.21, 5.22 (1H, t, H-10, 8'), 6.47 (1H, br s, H-8), 6.82 (2H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 7.00 (2H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6'), 8.05 (1H, br s, H-2), 13.34 (1H, s, 5-OH).

¹³C NMR (150 M Hz, acetone-*d*₆) $\delta_{\rm C}$: 154.1 (C-2), 121.5 (C-3), 180.7 (C-4), 159.2 (C-5), 111.4 (C-6), 162.3 (C-7), 93.2 (C-8), 155.7 (C-9), 104.7 (C-10), 123.4 (C-1'), 120.8 (C-2'), 144.9 (C-3'), 143.5 (C-4'), 128.3 (C-5'), 114.4 (C-6'), 21.4 (C-1"), 122.9 (C-2"), 131.3 (C-3"), 18.1(4-CH₃), 25.9 (5-CH₃), 28.7 (C-1"), 122.6 (C-2"), 131.1 (C-3"), 18.1(C-4"), 25.9 (C-5").

6,8-Diprenylorobol (18)

淡黄色針状結晶 mp 156 °C (文献値, mp 155-156 °C)²⁶⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 270 (4.43), 348 (3.38). ESI-MS *m*/*z* 423 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.65 (6H, br s, H-4"', 5""), 1.76 (3H, br s, -CH₃, H-4"), 1.85 (3H, br s, -CH₃, H-5"), 3.46 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-1"), 3.52 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1""), 5.22 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2", 2""), 6.68 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.94 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-6'), 7.14 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 8.21 (1H, br s, H-2), 13.34 (1H, s, 5-OH).

¹³C NMR151 MHz, acetone-*d*₆ δ_C: 159.7 (C-2), 123.4 (C-3), 181.8(C-4), 154.1 (C-5), 107.0 (C-6), 157.8(C-7), 105.9 (C-8), 154.0 (C-9), 112.2 (C-10), 123.6 (C-1'), 116.9 (C-2'), 144.1 (C-3') 146.0 (C-4'), 115.82 (C-5'), 121.2 (C-6'), 22.09 (C-1'') 122.7 (C-2''), 132.4 (C-3''), 25.7 (C-4''), 17.8 (C-5''), 22.1 (C-1'''), 123.4 (C-2'''), 132.2 (C-3'''), 25.6 (C-4'''), 17.7 (C-5''').

Glicoricone (19)

無色針状結晶 mp 193 °C (文献値, mp 192 °C)²⁸⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 210 (4.58), 247 (4.39) 285 (4.09). ESI-MS *m*/*z* 369 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) $\delta_{\rm H}$: 1.63, 1.73 (3H, br s, -CH₃), 3.29 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-1"), 3.40 (3H, s, -OCH₃), 5.20 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.37(1H, br s, H-3'), 6.94 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 7.02 (1H, dd, *J* = 2.4, 9 Hz, H-6), 8.05 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5), 8.10 (1H, br s, H-2).

Licoricone (20)

黄色粉末 (MeOH) λ_{max} (log ε): 257 (4.58), 293 (4.39). ESI-MS *m*/*z* 383 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.63, 1.73 (3H, br s, -CH₃), 3.27 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-8), 3.40, 3.80 (3H, s, -OCH₃), 5.14 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-9), 6.37 (1H, br s, H-3'), 6.92 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 7.02 (1H, dd, *J* = 2.4, 9 Hz, H-6), 8.06 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-5), 8.10 (1H, br s, H-2).

¹³C NMR151 MHz, acetone-*d*₆ δ_C: 158.6 (C-2), 119.3 (C-3), 177.6 (C-4), 128.3 (C-5), 115.6 (C-6), 162.3 (C-7), 103.2 (C-8), 159.5 (C-8a), 104.6 (C-1'), 157.2 (C-2'), 97.1 (C-3'), 158.9 (C-4'), 116.3 (C-4a), 112.6 (C-5'), 60.0 (C-6'), 123.4 (C-1''), 125.0 (C-2''), 130.5 (C-3''), 17.8 (C-4''), 25.8 (C-5''), 61.1 (-OCH₃), 55.9 (-OCH₃).

Glyasperin D (21)

無色プリズム mp 113 °C (文献値, mp 111-114 °C)⁶³⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 210 (4.75), 284 (4.01). ESI-MS *m/z* 371 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.62, 1.73 (3H, br s, -CH₃), 2.85 (1H, dd, *J* = 10.8, 17.8 Hz, H-4a), 2.90 (1H, ddd, *J* = 1.8, 6.6, 17.8 Hz, H-4b), 3.25 (2H, m, H-1'), 3. 40 (1H, m, H-3), 3.69 (3H, s, -OCH₃), 3.75 (3H, s, -OCH₃), 4.0 (1H, t, *J* = 9.6 Hz, H-2a), 4.23 (1H, ddd, *J* = 1.8, 3.0, 12 Hz, H-2b), 5.15 (1H, t, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 6.21 (1H, br s, H-8), 6.34 (1H, dd, *J* = 2.4, 7.8 Hz, H-5'), 6.45 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-3') 6.97 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

Glyasperin J (22)

淡黄色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 290 (4.82), 340 (3.46). ESI-MS *m*/z 425 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.37, 1.38 (3H, br s, CH₃), 1.67 (3H, br s, CH₃), 1.73 (3H, br s, CH₃), 3.26 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9), 4.19 (IH, dd, *J* = 6.6, 12.0 Hz, H-3), 4.48 (1H, dd, *J* = 6.6, 12.0 Hz, H-2), 4.56 (IH, t, *J* = 12.0 Hz, H-2), 5.21 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-10), 5.64 (1H, d, *J* = 12 Hz, H-8'), 6.10 (IH, br s, H-6), 6.42 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.68 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-7'), 6.92 (IH, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 12.36 (1H. s. 5-OH).

Glyasperin J trimethyl ether (23)

淡黄色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 292 (4.62), 341 (3.49). ESI-MS *m*/z 465 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.35, 1.37 (3H, br s, CH₃), 1.68, 1.75 (3H, br s, CH₃), 3.26 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9), 3.84, 3.87, 3.97 (3H, s, -OCH₃), 4.09 (lH, dd, *J* = 6.6, 12.0 Hz, H-3), 4.28 (1H, dd, *J* = 6.6, 12.0 Hz, H-2), 4.44 (lH, t, *J* = 12.0 Hz, H-2), 5.11 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-10), 5.59 (1H, d, *J* = 12 Hz, H-8'), 6.28 (lH, br s, H-6), 6.46 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-5'), 6.53 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-7'), 6.90 (lH, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

Glyasperin C (24)

無色針状結晶 mp 80 °C (文献値, mp 79-80 °C)⁶³⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 283 (4.98). ESI-MS *m*/*z* 357 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.62,1.73 (3H, br s, -CH₃), 2.80 (1H, dd, *J* = 10.8, 17.8 Hz, H-4a), 2.90 (1H, dd, *J* = 6.6, 17.8 Hz, H-4b), 3.25 (2H, m, H-1"), 3. 41(1H, m, H-3), 3.71 (3H, s, -OCH₃), 4.01 (1H, t, *J* = 9.6 Hz, H-2a), 4.23 (1H, dd, *J* = 1.8, 12.0 Hz, H-2b), 5.25 (1H, t, *J* = 2.4 Hz, H-2"), 6.21 (1H, s, H-8), 6.34 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.47 (1H, br s, H-3'), 6.97 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

Licoricidin (25)

無色針状結晶 mp 162 °C (文献値, mp 161-162 °C)⁶²⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 211 (4.68), 285 (3.69). ESI-MS *m*/*z* 425 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.63, 1.65, 1.74, 1.79 (3H, br s, -CH₃), 2.72 (1H, dd, *J* = 12.0, 15.0 Hz, H-4a), 2.89 (1H, ddd, *J* = 2.4, 6.6, 12.0 Hz, H-9a), 3.23 (1H, dd, *J* = 6.6, 12.0 Hz, H-6'), 3.29 (1H, dd *J* = 6.6, 12.0 Hz, H-9b), 3.38 (1H, m, H-3), 3.44 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-6'), 3.67 (3H, s, -OCH₃), 3.92 (1H, t, *J* = 12 Hz, H-2a), 4.16 (1H, ddd, *J* = 2.4, 4.2, 12.0 Hz, H-2b), 5.21 (2H, m, *J* = 12.0 Hz, H-10,7'), 6.16 (1H, br s, H-8), 6.48 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.81 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

<u>3'-(γ , γ -dimethylallyl)-Kievitone (26)</u>

無色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 209 (4.58), 290 (4.19). ESI-MS *m*/*z* 425 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.63, 1.74 (6H, br s, -CH₃), 3.23 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9), 3.39 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-7'), 4.08 (1H, t, *J* = 5.0 Hz, H-3), 4.66 (1H, dd, *J* = 6.0, 12.0 Hz, H-2a), 4.75 (1H, dd, *J* = 5.0, 12.0 Hz, H-2b), 5.21 (2H, m, H-10, 8'), 6.02 (1H, br s, H-6), 6.42 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-5'), 6.99 (1H, d *J* = 7.2 Hz, H-6'), 11.98 (1H, s, 5-OH).

Licopyranocoumarin (27)

黄色針状結晶 mp 137 °C (文献値, mp 137 °C)¹⁶⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 211 (4.61), 352 (4.24). ESI-MS *m*/*z* 385 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.32 (3H, br s, CH₃), 1.85 (1H, dt, *J* = 6.6, 17.8 Hz, H-7a), 2.12 (1H, ddd, *J* = 6.6, 8.4, 17.8 Hz, H-7b), 2.86 (1H, ddd, *J* = 6.6, 9.6, 17.8 Hz, H-6a), 2.92 (1H, dt, *J* = 6.6, 17.8 Hz, H-6b), 3. 64, 3.69 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, -CH₂OH), 3.95 (3H, s, -OCH₃), 6.48 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.55 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 6.56 (1H, br s, H-10), 7.24 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 8.03 (1H, br s, H-4).

Isoglycycoumarin (28)

黄色針状結晶 mp 235 °C (文献値, mp 235 °C)¹⁶⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 211 (4.91), 254 (4.01), 352 (4.29). ESI-MS *m/z* 367 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.36 (6H, br s, -CH₃), 1.87 (2H, t, *J* = 8.4 Hz, H-7), 2.84 (2H, t, *J* = 8.4 Hz, H-6), 3.91 (3H, s, -OCH₃), 6.44 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.47 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-3'), 6.50 (1H, br s, H-10), 7.22 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 7.97 (1H, br s, H-4).

Licoarylcoumarin (29)

黄色針状結晶 mp 161 °C (文献値, mp 160 °C)¹⁶⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 267 (3.93), 356 (4.00). ESI-MS *m/z* 367 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_H: 1.68

(6H, br s, -CH₃), 3.91 (3H, s, -OCH₃), 4.93 (1H, dd, *J* = 1.2, 10.6 Hz, H-3"), 5.01 (1H, dd, *J* = 1.2, 17.4 Hz, H-3"), 6.37 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.6 Hz, H-2"), 6.44 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-5'), 6.45 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 6.47 (1H, br s, H-6), 7.20 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 8.07 (1H, br s, H-4).

Glycyrin (30)

黄色針状結晶 mp 210 °C (文献値, mp 208-211 °C)³¹⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 210 (4.44), 354 (4.01). ESI-MS *m*/*z* 383 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) $\delta_{\rm H}$: 1.65,1.77 (3H, bs s, -CH₃), 3.37 (2H, t, *J* = 8.4 Hz, H-1"), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 3.97 (3H, s, -OCH₃), 5.13 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.43 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.48 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 6.80 (1H, br s, H-8), 7.23 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 7.95 (1H, br s, H-4).

Glycycoumarin (31)

黄色針状結晶 mp 235 °C (文献値, mp 235 °C)¹⁶⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 212 (4.94), 356 (4.47). ESI-MS *m/z* 369 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.65, 1.78 (3H, br s, -CH₃), 3.39 (2H, t, *J* = 8.4 Hz, H-1"), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 5.13 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.44 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.47 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3"), 6.66 (1H, br s, H-8), 7.22 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 7.96 (1H, br s, H-4).

Demethylhomopterocarpan (32)

自色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 259 (4.43), 345 (4.23). ESI-MS *m/z* 271 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 3.18 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-3), 3.59 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-2a), 3.71 (3H, s, -OCH₃), 4.26 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-2b), 5.51 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-4), 6.34 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 6.36 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-7), 6.43 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.55 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5), 7.22 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 7.31 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6).

Glycyrol (33)

無色プリズム mp 245 °C (文献値, mp 245-248 °C)³¹⁾. UV (MeOH) \Box_{max} (log ε): 210 (4.52), 246 (4.43), 345 nm (4.42). ESI-MS *m/z* 367 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone*d*₆) $\delta_{\rm H}$: 1.67, 1.81 (3H, br s, -CH₃), 3.46 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-1"), 3.98 (3H, s, -OCH₃), 5.28 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.80 (1H, br s, H-8), 7.01 (1H, dd, *J* = 2.4 , 8.4 Hz, H-5'), 7.22 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 7.79 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

¹³C NMR 151 MHz, acetone- $d_6 \delta_C$: 152.9 (C-1), 119.7 (C-2), 157.4 (C-3), 98.5 (C-4), 153.8 (C-4a), 158.1 (C-6), 103.9 (C-6a), 114.1 (C-6b), 119.9 (C-7), 113.6 (C-8), 156.3 (C-9), 98.4 (C-10), 155.9 (C-10a), 159.4 (C-11a), 102.2 (C-11b), 22.0 (C-1'), 122.4 (C-2'), 130.8 (C-3'), 17.7 (C-4'), 25.4 (C-5'), 62.3 (-OCH₃).

Isoglycyrol (34)

無色針状結晶 mp 300 °C (文献値, mp 298-300 °C)⁶²⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 248 (4.32), 345 (4.47). ESI-MS *m*/*z* 367 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.21 (6H, br s, -CH₃), 1.93(2H, t, *J* = 8.4 Hz, H-7), 2.95 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 4.04 (3H, s, -OCH₃), 6.78 (1H, br s, H-10), 7.02 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 7.20 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-3'), 7.78 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

Demethylglycyrol (35)

淡黄色微結晶性粉末 mp 265 °C; UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}} \log \varepsilon$: 210 (4.47), 259 (4.45), 345 (4.23). ESI-MS *m*/z 353 [M+H]⁺. HR-FAB-MS m/z 353.0990 [M+H]⁺ (Calcd for C₂₀H₁₇O₆, 353.1025). ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.60,1.77 (3H, br s, -CH₃), 3.12 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 5.07 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.25 (1H, br s, H-4), 6.71 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.80 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 7.25 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

¹³C NMR (151 MHz, acetone- d_6) δ_C : 160.4 (C-1), 113.9 (C-2), 158.5 (C-3), 99.4 (C-4), 156.4 (C-4a), 160.1 (C-6), 104.0 (C-6a), 114.9 (C-6b), 119.9 (C-7), 111.9 (C-8), 156.6

(C-9), 98.4 (C-10), 156.1 (C-10a), 158.6 (C-11a), 104.1 (C-11b), 23.25 (C-1'), 125.1 (C-2'), 130.5 (C-3'), 25.8 (C-4'), 17.9 (C-5').

Gancaonin I (36)

淡黄色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 215 (4.56), 324 (4.45), 337 (4.23). ESI-MS *m/z* 355 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.62, 1.76 (3H, br s, -CH₃), 3.37 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-1"), 3.87, 4.01 (3H, s, -OCH₃), 5.18 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.49 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3'), 6.51 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.88 (1H, br s, H-7), 7.30 (1H, br s, H-3), 7.70 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

¹³C NMR (151 MHz, acetone-*d*₆) $\delta_{\rm C}$: 151.9 (C-2), 101.8 (C-3), 156.9 (C-4), 115.14 (C-3a), 116.7 (C-5), 151.6 (C-6), 90.1 (C-7), 154.9 (C-7a), 110.9 (C-1'), 156.2 (C-2'), 103.9 (C-3'), 159.2 (C-4'), 108.3 (C-5'), 128.0 (C-6'), 23.3 (C-1''), 124.9 (C-2''), 130.5 (C-3''), 17.8 (C-4''), 25.8 (C-5''), 60.4 (-OCH₃), 56.4 (-OCH₃).

Licocoumarone (37)

無色針状結晶 mp 184 °C (文献値, mp 182-185 °C)³¹⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 213 (4.54), 321 (4.47), 336 (4.46). ESI-MS *m*/*z* 341 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone*d*₆) $\delta_{\rm H}$: 1.65,1.78 (3H, br s, -CH₃), 3.39 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-1"), 4.04 (3H, s, -OCH₃), 5.20 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-2"), 6.44(1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 6.55 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 6.76 (1H, br s, H-7), 7.29 (1H, br s, H-3), 7.70 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6').

Glycybenzofuran (38)

淡褐色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 209 (4.43), 248 (4.17), 305(4.23). ESI-MS *m/z* 355 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.67, 1.75 (3H, br s, -CH₃), 2.05 (3H, br s, -CH₃), 3.27 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 3.36 (3H, s, -OCH₃), 5.21 (1H, m, H-2"), 6.23 (1H, s, H-5'), 6.73 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-5), 6.84 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-7), 7.29 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, acetone-*d*₆) δ_{C} : 146.7 (C-2), 115.1 (C-3), 120.0 (C-4), 112.1 (C-5), 156.1 (C-6), 98.6 (C-7), 157.1 (C-8), 124.5 (C-9), 8.9 (C-10), 104.6 (C-1'), 160.5 (C-2'), 114.6 (C-3'), 159.1 (C-4'), 96.6 (C-5'), 156.7 (C-6'), 23.5 (C-1''), 125.4 (C-2''), 131.1 (C-3''), 18.0 (C-4''), 26.0 (C-5''), 61.3 (-OCH₃).

<u>4'-O-Methyl glycybenzofuran (39)</u>

淡褐色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 214 (4.11), 238 (4.01), 305 (4.52). ESI-MS *m/z* 369 [M+H]⁺. HR-FAB-MS m/z 369.1702 [M+H]⁺, (Calculated for C₂₂H₂₄O₅, 369.1709). ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 1.60, 1.70 (3H, br s, -CH₃), 1.89 (3H, br s, -CH₃), 3.32 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 3.35, 3.82 (3H, s, -OCH₃), 5.16 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-2"), 6.41 (1H, br s, H-5'), 6.77 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, H-5), 6.87 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-7), 7.30 (1H, d, *J* = 9 Hz, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, acetone-*d*₆) δ_{C} : 145.7 (C-2), 114.2 (C-3), 119.6 (C-4), 111.5 (C-5), 158.8 (C-6), 97.9 (C-7), 156.2 (C-8), 123.0 (C-9), 7.9 (C-10), 102.1 (C-1'), 158.9 (C-2'), 114.2 (C-3'), 160.0 (C-4'), 96.6 (C-5'), 153.1 (C-6'), 22.5 (C-1''), 124.3 (C-2''), 129.9 (C-3''), 17.2 (C-4''), 25.3 (C-5''), 60.7 (-OCH₃), 55.0 (-OCH₃).

Neoglycybenzofuran (40)

淡褐色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 210 (4.09), 238 (4.21), 300 (4.30). ESI-MS *m/z* 355 [M+H]⁺. HR-FAB-MS m/z 355.1546 [M+H]⁺, (Calculated for C₂₁H₂₂O₅, 355.1549). ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) $\delta_{\rm H}$: 1.63, 1.69 (3H, br s, -CH₃), 1.97 (3H, br s, -CH₃), 3.13 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 3.28 (3H, s, -OCH₃), 5.12 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-2"), 6.28 (1H, br s, H-5'), 6.71 (1H, dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, H-5), 6.82 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-7), 7.23 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-4).

¹³C NMR (151 MHz, acetone-*d*₆) δ_{C} : 145.5 (C-2), 114.4 (C-3), 119.3(C-4), 111.4 (C-5), 155.7 (C-6), 97.8 (C-7), 156.2 (C-8), 123.8 (C-9), 8.7 (C-10), 103.5 (C-1'), 159.1 (C-2'), 112.9 (C-3'), 160.0 (C-4'), 98.7 (C-5'), 155.7 (C-6'), 22.9 (C-1''), 124.6 (C-2''), 129.7 (C-3''), 17.8 (C-4''), 25.5 (C-5''), 60.6 (-OCH₃).

Licoriphenone (41)

無色針状結晶 mp 138 °C (文献値, mp 138 °C)⁴⁸⁾. UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 209 (4.68), 276 (4.19), 314 (4.00). ESI-MS *m/z* 373 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone*d*₆) $\delta_{\rm H}$: 1.62, 1.73 (3H, br s, -CH₃), 3.25 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1"), 3.41(1H, m, H-3), 3.62, 3.75 (3H, s, -OCH₃), 4.24 (2H, s, H-8), 5.20(1H, t, *J* = 2.4 Hz, H-2"), 6.34 (1H, br s, H-5'), 6.46 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 8.06 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6).

p-Hydroxybenzoic acid (42)

無色針状結晶 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 254 (4.00). ESI-MS *m*/*z* 127 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 6.73 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-2, 6), 7.83 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3, 5).

3-(p-Hydroxyphenyl)-7-methoxycoumarin (43)

無色粉末 UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 211 (4.33), 257 (4.11). ESI-MS *m*/*z* 269 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ_{H} : 3.84 (3H, s, -OCH₃), 6.43 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-6), 6.81 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, *J* = Hz, H-3', 5') 7.09 (1H, d, *J* = Hz, H-5), 7.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-8), 7.97 (1H, br s, H-4).

化合物 35 のメチル化

化合物 **33** 及び **35** (1.5 mg) を (0.2 mL) EtOH に溶かして CH₂N₂/Et₂O 液 (1 mL) を加えて 3 時間静置した.反応後乾固し,残渣を分取 TLC [CHCl3: MeOH (15:1, v/v)] で精製し,化合物 **35** それぞれ glycyrol (**33**) (0.5 mg), 1-*O*-methylglycyrol (**44**) (0.3 mg), 1,9-di-*O*-methylglycyrol (**45**) (0.3 mg) を得た.化合物 **33** それぞれ 1-*O*-methylglycyrol (**44**) (0.6 mg), 1,9-di-*O*-methylglycyrol (**45**) (0.5 mg) を得た.

1-O-Methylglycyrol (44)

¹H NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ_{H} : 1.66, 1.81 (3H, br s, -CH₃), 3.44 (2H, d, J = 7 Hz, H-1"), 4.00, 4.02 (3H, s, -OCH₃), 5.22 (1H, t, J = 7 Hz, H-2"), 6.95 (1H, br s, H-8), 7.05 (1H, dd, J = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 7.23 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3'), 7.82 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'), 7.97 (1H, br s, H-2).

1,9-Di-O-methylglycyrol (45)

¹H NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ_{H} : 1.66, 1.81 (3H, br s, -CH₃), 3.44 (2H, d, J = 7 Hz, H-1"), 4.00, 4.01, 4.02 (3H, s, -OCH₃), 5.22 (1H, t, J = 7 Hz, H-2"), 6.95 (1H, br s, H-8), 7.05 (1H, dd, J = 2.4, 8.4 Hz, H-5'), 7.23 (1H, d, J = 2 Hz, H-3'), 7.82 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'), 7.97 (1H, br s, H-2).

化合物 39,40 のメチル化

化合物 38, 39 および 40 (1.0 mg) を (0.1 mL) EtOH に溶かして CH₂N₂/Et₂O 液 (1 mL) を加えて 3 時間静置した.反応後乾固し,残渣を分取 TLC [CHCl₃: MeOH (15:1)] で精製し,化合物 39 は glycybenzofuran tetrarmethyl ether (46) (0.5 mg)を 得た.化合物 38, 40 それぞれ 4'-O-methylglycybenzofuran (39) (0.4 mg) および glycybenzofuran tetrarmethyl ether (46) (0.3 mg) を得た.

Glycybenzofuran tetrarmethyl ether (46)

¹H NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ_{H} : 1.63, 1.73, 1.9 (3H, br s, -CH₃), 3.29, 3.38, 3.59, 3.82 (3H, s, -OCH₃), 3.26 (2H, d, J = 6.6 Hz, H-1"), 5.18 (1H, t, J = 7 Hz, H-2"), 6.41 (1H, br s, H-5'), 6.78 (1H, dd, J = 2.4, 8.4 Hz, H-5), 6.88 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7), 7.35 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-4).

第3章 甘草のフェノール性成分のバンコマイシン耐性腸球菌に対する抗生物 質耐性抑制作用に関する実験

1. 菌株と培養条件

本研究では、VREの菌株として、いずれも群馬大学池教授から恵与された臨 床分離株 *E. faecalis* FN-1 および *E. faecium* NCTC12201 が使用され、本学黒田照 夫准教授によって抗菌作用の検討が実施された. 培地には Muller-Hinton 培地 (DIFCO) に Ca²⁺と Mg²⁺をそれぞれ 50 μ g/L と 25 μ g/L 添加したもの (Cationsupplemented Mueller-Hinton broth: CSMHB) を用い 37 ℃で好気的に培養を行っ た.

2. 試料, 抗菌薬の溶解及び希釈法

水溶性の薬剤は滅菌蒸留水で溶解し、水に不溶ないし難溶性のものについて は 50% DMSO または 100% DMSO に溶解させた. 有機溶媒の濃度は終濃度 5%以 下になるように調製をおこない薬剤原液とした. 薬剤原液の希釈には CSMHB を用い、下記のような 2 倍希釈系列を作った、希釈系列 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 µg/mL.

3. MIC の測定

日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法に従い, MIC を測定した. 感受測定 用培地は上記の CSMHB を用い,中期対数増殖期 (O.D. 650 = 0.6~0.7) まで培養 した. CSMHB 培地でこの被菌検体を 0.85% 生理食塩水で 103 分の 1 に希釈し, U 字型ウェルの 96 穴マイクロプレート (FALCON) の各ウェルに 5 μL ずつ, 最終 接種菌量約 10⁵ CFU (colony forming unit)/ウェルになるように接種した. 試料は 1 ウェルあたり測定培地の 100 μL 分注した. 37℃で静置培養し, 培養後 20~24 時 間の間に菌の発育が肉眼的に認められないウェルの中, 最小の薬剤濃度を持っ て MIC とした. 第4章 主要なフェノール性成分の HPLC による一斉分析の条件および定量分 析の検討の実験

4-1. 甘草抽出物中のフェノール性成分の分析条件の検討

東北甘草および 50gについて粉砕機で破砕し, n-ヘキサンで一夜冷浸し, 脱脂後, 酢酸エチルで同様に一夜冷浸し, 抽出を行った. この酢酸エチルエキスについて, HPLC による主要成分の分析条件の検討を行った.

ポンプは HITACHI L-2130, 検出器は HITACHI L-2155, オーブンは Sugai U-620 を使用した.

逆相系のカラムとしては,

YMC-Pack SIL A-302 (4.6 mm i.d. × 250 mm) (YMC Co, LTD)

YMC-Pack Pro C8 (4. 6 mm i.d. × 150 mm) (YMC Co, LTD)

YMC-Pack Pro C18 (6.0 mm i.d. × 150 mm) (YMC, Kyoto, Japan) 溶媒としては

 $H_2O - CH_3CN - CH_3COOH (70:28:2, v/v/v)$

 $H_2O - CH_3CN - CH_3COOH (60:35:5, v/v/v)$

 $H_2O - CH_3CN - CH_3COOH(55:40:5, v/v/v)$

 $H_2O - CH_3CN - CH_3COOH (50:45:5, v/v/v)$

について検討した.

これらの検討の結果, YMC-Pack Pro C18 (6.0 mm i.d. × 150 mm) (YMC, Kyoto, Japan) をカラムとして使用し, H₂O – CH₃CN – CH₃COOH (55:40:5, v/v/v) を展 開溶媒として使用した際に, 最も良好に各ピークが分離できた.

そこで、この条件で主要成分の分析を行った.

4-2. 甘草の主要なフェノール性成分の LC-MS 分析

以下に示す条件で LC-MS により, 各成分のエキス中の存在について確認を行った.

Pump: Shimadzu LC-20A (Shimadzu)

MS: amaZon X and ETD (Bruker)

装置条件

Capillary: - 4500 v

Nebulizer: 8.0 psi

Dry Gas: 5.0 L/min. Heium gas

Dry Temperature 220 °C

Infusion Syring pump flow rate 240.00 μ L/L

Column: YMC Triart C18 (2.0 mm i.d. × 100mm) (YMC)

Temperature: 40 °C

Mobile phase:

solvent A: $H_2O - CH_3CN - HCOOH (70: 30: 1\%, v/v/v)$

solvent B: H₂O – CH₃CN – HCOOH (50 : 50 : 1%, v/v/v)

Gradient condition:

0-15 min, 5% solvent B;

15-30 min, 5%-30% solvent B;

30-60 min, 30%-100% solvent B;

60-70 min, 100%-50% solvent B in 1%-50% solvent A;

70-75 min, finally, reconditioning the column with 100% solvent A isocratic

for 5 min at the flow rat;

Flow rate: 0.2 mL/min
4-3. 主要なフェノール性成分の定量分析

甘草の酢酸エチル粉末から調製した試料の HPLC 分析によって得られたクロ マトグラムにおいて,明瞭なピークを示した以下の8種の成分について,各ピー クの面積から,絶対検量線法により含量を求めた.

1. HPLC 条件

DAD 検出器で 280 nm をモニター波長として使用し, カラムは YMC-Pack Pro C18 (6.0 mm i.d. ×150 mm),移動相としては H₂O-CH₃CN-CH₃COOH (55:40:5, v/v/v) を使用し, 流速 1.0 mL/min, カラム温度 40°C で分析を行った.

2. 標品

東北甘草から単離した isoangustone A (17), 6,8-diprenylorobol (18), glicoricone (19), glycyrin (30), glycycoumarin (31), glycyrol (33), gancaonin I (36), licoriphenone (41) を定量用の標品とした.

3. 定量分析

東北甘草 10 g について粉砕機で破砕し, *n*-ヘキサンで一夜冷浸し, 脱脂後, 酢酸エチルで同様に一夜冷浸し, 抽出を行った. この酢酸エチルエキス(400 mg) のうち, 10 mg を MeOH 10 mL に溶解し, またそれぞれの濃度が 1~0.1 mg/mL となるように希釈した. 調製した試料を 0.45 μ m の PTFE メンブランフィルターで濾過し, ろ液 8 μ L を注入して HPLC 分析を行った. 甘草のフェノール性成分については, 各化合物 1.0 mg を MeOH 10 mL に溶解し, さらにその濃度が 0.1~0.01 mg/mL となるように希釈した. PTFE メンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過し, このろ液 8 μ L を HPLC に注入して得られた HPLC クロマトグラフィーの各ピーク面積 (y) と, 標準溶液の濃度 (x) との間には良好な直線性が得られ, それらの間には以下のような回帰直線式が得られた.

isoangustone A (17): y = 0.92 + 5.97x

6,8-diprenylorobol (**18**): y = 1.09 + 5.73x

glicoricone (**19**): y = 1.01 + 5.89x

glycyrin (**30**): y = 1.0 + 5.90x

glycycoumarin (**31**): y = 1.086 + 5.73xglycyrol (**33**): y = 0.98 + 6.23xgancaonin I (**36**): y = 0.96 + 6.17xlicoriphenone (**41**): y = 0.89 + 5.38x

これらの回帰直線式に基づき主要各ピークのフェノール性成分の含量を求めた.

謝 辞

本研究を終えるにあたり,薬学部全般についての貴重な知識のご教授と,研 究の方向性,漢方薬の研究方法,論文のまとめ方など,数多くの遂行にあたり懇 切丁寧なご指導,ご助言をいただき,また学会発表の貴重な機会を与えてくだ されました岡山大学薬学部 波多野 力 教授に心より深く感謝いたします.

また公私両面においてご指導,ご助言をいただきました岡山大学薬学部附属 薬用植物園 谷口 抄子 准教授に深く感謝いたします.

抗菌活性試験を実施していただきました.ご指導をいただきました岡山大学 医歯薬総合研究科分子微生物教室 黒田 照夫 准教授に深く感謝いたします.

また研究のとりまとめに際して, 種々のご助言をいただきました Mohamed A. A. Orabi 博士, 青山 弘枝 修士, 斉 敬浩 研究生に感謝いたします. また 7 年間公私にわたって様々な面で支えてくださった生薬学教室の諸先輩方および同輩の皆様に心より感謝いたします.

最後に終始ご支援,激励頂きました両親及び家族に感謝いたします.

参考文献

- Isbrucker, R. A.; Burdock, G. A. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2006, 46, 167–192.
- 2. Shen, X.-P.; Xiao, P.-G.; Liu, C.-X. Research and application of *Radix Glycyrrhizae*. *Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics* **2007**, *7*, 181–200.
- 3. Asl, M. N.; Hosseinzadeh, H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research* **2008**, *22*, 709–724.
- 4. Messier, C.; Epifano, F.; Genovese, S.; Grenier, D. Licorice and its potential beneficial effects in common oro dental diseases. *Oral diseases* **2012**, *18*, 32–39.
- Villinski, J. R.; Bergeron, C.; Cannistra, J. C.; Gloer, J. B.; Coleman, C. M.; Ferreira, D.; Gafner, S. Pyrano-isoflavans from *Glycyrrhiza uralensis* with Antibacterial Activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Nat. Prod.* 2014, in press.
- Gafner, S.; Bergeron, C.; Villinski, J. R.; Godejohann, M.; Kessler, P.; Cardellina, J. H.; Grenier, D. Isoflavonoids and coumarins from *Glycyrrhiza uralensis*: antibacterial activity against oral pathogens and conversion of isoflavans into isoflavan-quinones during purification. *J. Nat. Prod.* 2011, 74, 2514–2519.
- He, J.; Chen, L.; Heber, D.; Shi, W.; Lu, Q. Y. Antibacterial Compounds from Glycyrrhiza u ralensis. J. Nat. Prod. 2006, 69, 121–124.
- Fukai, T.; Marumo, A.; Kaitou, K.; Kanda, T.; Terada, S.; Nomura, T. Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life sciences* 2002, 71, 1449– 1463.
- Otsuka, N.; Liu, M.–H.; Shiota, S.; Ogawa, W.; Kuroda, T.; Hatano, T.; Tsuchiya, T. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis. Biol. Pharm. bull.* 2008, *31*, 1794–1797.
- Hatano, T.; Kusuda, M.; Inada, K.; Ogawa, T.; Shiota, S.; Tsuchiya, T.; Yoshida, T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 2005, *66*, 2047–2055.

- Hatano, T.; Shintani, Y.; Aga, Y.; Shiota, S.; Tsuchiya, T.; Yoshida, T. Phenolic constituents of licorice. VIII. Structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem. Pharm. Bull.* 2000, *48*, 1286–1292.
- McNeil, S. A.; Clark, N. M.; Chandrasekar, P. H.; Kauffman, C. A. Successful treatment of vancomycin–resistant *Enterococcus faecium* bacteremia with linezolid after failure of treatment with synercid (quinupristin/dalfopristin). *Clin Infect Dis.* 2000, *30*, 403–404.
- 13. Fukai, T.; Oku, Y.; Hano, Y.; Terada, S. Antimicrobial activities of hydrophobic 2arylbenzofurans and an isoflavone against vancomycin-resistant *Enterococci* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 685–687.
- Klein-Junior, C.; Santin, J. R.; Andrade, S. F. Antiulcer agents from higher plants [J]. plant bioactives and drug discovery. *Principles practice and perspectives* 2012, *17*, 188–241.
- Farag, M. A.; Porzel, A.; Wessjohann, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC–MS, LC–MS and 1D NMR techniques. Phytochemistry 2012, 76, 60–72.
- Hatano, T.; Yasuhara, T.; Fukuda, T.; Noro, T.; Okuda, T. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoarylcoumarin and glisoflavone, and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* 1989, *37*, 3005–3009.
- Valesi, A. G.; Rodriguez, E.; Vander Velde, G.; Mabry, T. J. Methylated flavonols in Larrea cuneifolia. Phytochemistry 1972, 11, 282–2826.
- 18. Xiao, Z. P.; Wu, H. K.; Wu, T.; Shi, H.; Hang, B.; Aisa, H. A. Kaempferol and quercetin flavonoids from *Rosa rugosa*. *Chem. Nat. Compd.* **2006**, *42*, 736–737.
- 19. Zheng, Z. P.; Cheng, K. W.; Chao, J.; Wu, J.; Wang, M. Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *Food Chemistry* **2008**, *106*, 529–535.
- 20. Shen, F. J.; Hu, J. F.; Yu, Y. C.; Xu, Z. D. Studies on chemical constituents of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* **1995**, *16*, 574–574.
- 21. Nakanishi, T.; Inada, A.; Kambayashi, K.; Yoneda, K. Flavonoid glycosides of the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 339–341.

- 22. Tahara, S.; Shibaki, S.; Ingham, J. L.; Mizutani, J. Further isoflavonoids from white lupin roots. *Z. Naturforsch. C* **1990**, *45*, 147–153.
- Chang, Y. C.; Nair, M. G.; Santell, R. C. Microwave-mediated synthesis of anticarcinogenic isoflavones from soybeans. J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 1869– 1871.
- 24. Kiuchi, F.; Chen, X.; Tsuda, Y. Four new phenolic constituents from licorice (root of *Glycyrrhiza* sp.). *Heterocycles* **1990**, *31*, 629–636.
- Fukai, T.; Wang, Q. H.; Kitagawa, T.; Litaka, Y. Structures of six isoprenoidssubstituted flavonoids, gancaonins F, G, R, I, glycyrol, and isoglycyrol from xibei licorice (*Glycyrrhiza* sp). *Heterocycles* 1989, 29, 1761–1772.
- Nkengfack, A. E.; Sanson, D. R.; Fomum, Z. T.; Tempesta, M. S. 8-Prenylluteone, a prenylated isoflavone from *Erythrina eriotriocha*. *Phytochemistry* 1989, 28, 2522– 2526.
- Hatano, T.; Fukuda, T.; Miyase, T.; Noro, T.; Okuda, T. Phenolic constituents of licorice. III. Structures of glicoricone and licofuranone, and inhibitory effects of licorice constituents on monoamine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* 1991, *39*, 1238 – 1243.
- Kaneta, M.; Saitoh, T.; Iitaka, Y.; Shibata S. Chemical studies on the oriental plant drugs. XXXVI. Structure of licoricone, a new isoflavone from licorice root. *Chem. Pharm. Bull.* **1973**, *21*, 1338–1341.
- Kwon, H. J.; Kim, H. H.; Ryu, Y.B.; Kim, J. H.; Jeong, H. J.; Lee, S.W.; Lee, W.S. In vitro anti-rotavirus activity of polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis. Bioor. Med. Chem.* 2010, *18*, 7668–7674.
- Hatano, T.; Yasuhara, T.; Miyamoto, T.; Okuda, T. Anti-human immunodeficiency virus phenolics from licorice. *Chem. Pharm. Bull.* 1988, *36*, 2286–2288.
- Shul'ts, E. E.; Petrova, T. N.; Shakirov, M. M.; Chernyak, E. I.; Tolstikov, G. A. Flavonoids of roots of *Glycyrrhiza uralensis* growing in Siberia. *Chem. Nat. Compd.* 2000, *36*, 362–368.
- Zhu, D. Y.; Song, G. Q.; Jian, F. X.; Chang, X. R.; Guo, W. B. Chemical constituents of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch - Structures of isolicoflavonol and glycycoumarin. *Huaxue Xuebao* 1984, 42, 1080–1084.

- Shiozawa, T.; Urata, S.; Kinoshita, T.; Saitoh, T. Revised structures of glycyrol and isoglycyrol, constituents of the root of *Glycyrrhiza uralensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 1989, *37*, 2239–2240.
- 34. Nomura, T.; Fukai, T.; Wang, Q. H. Four new prenylated flavonoids from aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis*. *Heterocycles* **1989**, *29*, 1761–1772.
- Kiuchi, F.; Chen, X.; Tsuda, Y.; Four new phenolic constituents from licorice (root of *Glycyrrhiza* sp.). Heterocycles **1990**, *31*, 629–636.
- 36. 高木 美幸の修士論文, 甘草のポリフェノール成分の研究 1997.
- Hatano, T.; Takagi, M.; Ito, H.; Yoshida, T. Phenolic constituents of liquorice. VII. A new chalcone with a potent radical scavenging activity and accompanying phenolics from liquorice. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1485–1492.
- Hatano, T.; Kagawa, H.; Yasuhara, T.; Okuda, T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 1988, *36*, 2090–2097.
- Tahara, S.; Ingham, J. L.; Mizutani, J. Metabolites of 7-O-methylluteone from Botrytis cinerea. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 1989, 63, 999–1007.
- Singhal, A. K.; Sharma, R. P.; Thyagarajan, G.; Herz, W.; Govindan, S. V. New prenylated isoflavones and a prenylated dihydroflavonol from *Millettia pachycarpa*. *Phytochemistry* **1980**, *9*, 929–934.
- Sil Lee, Y.; Ha Kim, S.; Kyu Kim, J.; Shin, H.K.; Kang, Y.H.; Park, Y.; Lim, S.S. Rapid identification and preparative isolation of antioxidant components in licorice. *J. Sep. Sci.* 2010, *33*, 664–671.
- 42. Zeng, L.; Fukai, T.; Nomura, T.; Zhang, R. Y.; Lou, Z. C.; Fukai, T.; Nomura, T. Five new isoprenoid-substituted flavonoids, glyasperins F, G, H, I, and J from the roots of *Glycyrrhiza aspera*. *Heterocycles* **1992**, *34*, 1813–1828.
- Park, S. Y.; Lim, S. S.; Kim, J. K.; Kang, I. J.; Kim, J. S.; Lee, C.; Park, J. H. Y. Hexane–ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* containing licoricidin inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells. *Brit. J. Nutr.* 2010, *104*, 1272–1282.
- 44. O'Neill, M. J.; Adesanya, S. A.; Roberts, M. F.; Inez, R. P. Inducible isoflavonoids from the lima bean, *Phaseolus lunatus*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1315–1322.

- 45. Hatano, T.; Yasuhara, T.; Fukuda, T.; Noro, T.; Okuda, T. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoarylcoumarin and glisoflavone, and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 3005–3009.
- 46. Sasaki, H.; Kashiwada, Y.; Shibatav, H.; Takaishi, Y. Prenylated flavonoids from the roots of *Desmodium caudatum* and evaluation of their antifungal activity. *Planta Med.* 2012, 78, 1851–1856.
- 47. Tanimoto, K.; Ike, Y. バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) モダンメディア2007, 6, 140-147.
- Li, S.; Li, W.; Wang, Y.; Asada, Y.; Koike, K. Prenyl flavonoids from *Glycyrrhiza* uralensis and their protein tyrosine phosphatase-1B inhibitory activities. *Bioo. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 5398–5401.
- Kiuchi, F.; Chen, X.; Tsuda, Y.; Four new phenolic constituents from licorice (root of *Glycyrrhiza* sp.). Heterocycles **1990**, *31*, 629–636.
- Jones, R. N.; Sader, H. S.; Erwin, M. E. Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates I: prevalence data from 97 medical cente surveillance studies in the United States. *R. N. Jones et al.* 1995, *21*, 85–93.
- 51. 山口敏行, 前崎繁文. バンコマイシン耐性腸球菌 (新版 処方計画法) (感染症). *綜合臨床* 2008, 57, 1151–1153.
- Horiuchi, K.; Shiota, S.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Kuroda, T.; Tsuchiya, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from Salvia officinalis and related compounds on vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE). *Biol. Pharm. Bull.* 2007, 30, 1147–1149.
- 53. Orsi, G. B.; Ciorba, V. Vancomycin resistant *Enterococci* healthcare associated infections. *Ann Ig* **2013**, 25, 485–492.
- 54. Rice, L. B. Emergence of vancomycin-resistant *Enterococci. Emerg. Infect. dis.* 2001, 7, 183–187.
- Badr, A. E.; Omar, N.; Badria, F. A. A laboratory evaluation of the antibacterial and cytotoxic effect of liquorice when used as root canal medicament. *Int. Endod. J.* 2011, 44, 51–58.
- 56. Fukai, T.; Oku, Y.; Hano, Y.; Terada, S. Antimicrobial activities of hydrophobic 2-Arylbenzofurans and an isoflavone against vancomycin-resistant *Enterococci* and

methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Planta Med. 2004, 70, 685-687.

- Zhang, Q.; Ye, M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). J. Chromatogr. A. 2009, 1216, 1954–1969.
- Chen, X. J.; Zhao, J.; Meng, Q.; Li, S. P.; and Wang, Y. T. Simultaneous determination of five flavonoids in licorice using pressurized liquid extraction and capillary electrochromatography coupled with peak suppression diode array detection. *J. Chromatogr. A.* 2009, *1216*, 7329–7335.
- 59. Liang, X.; Zhang, L.; Zhang, X.; Dai, W.; Li, H.; Hu, L.; Zhang, W. Qualitative and quantitative analysis of traditional Chinese medicine Niu Huang Jie Du Pill using ultra performance liquid chromatography coupled with tunable UV detector and rapid resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 565–571.
- Seo, C. S.; Lee, J. A.; Jung, D.; Lee, H. Y.; Lee, J. K.; Ha, H.; and Shin, H. K. Simultaneous determination of liquiritin, hesperidin, and glycyrrhizin by HPLCphotodiode array detection and the anti-inflammatory effect of Pyungwi-san. *Arch. Pharm. Res.* 2011, *34*, 203–210.
- Wen, J.; Qiao, Y.; Yang, J.; Liu, X.; Song, Y.; Liu, Z.; Li, F. UPLC–MS/MS determination of paeoniflorin, naringin, naringenin and glycyrrhetinic acid in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of SiNiSan decoction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 66, 271–277.
- Zhou, S.; Cao, J.; Qiu, F.; Kong, W.; Yang, S.; and Yang, M. Simultaneous Determination of five bioactive components in radix glycyrrhizae by pressurised liquid extraction combined with UPLC–PDA and UPLC/ESI–QTOF–MS confirmation. *Phytochem. Anal.* 2013, 24, 527–533
- Tamotsu, S.; Shibata, S. Chemical Studies on the Oriental Plant Drugs. XXII. Some New Constituents of Licorice Root. (2)²⁾ Glycyrol, 5-O-Methylglycyrol and Isoglycyrol. *Chem. Pharm. Bull.* 1969, 17, 729–734.
- 64. Zeng, L.; Fikau, T.; Nomura, T.; Zhang, R. Y.; Lou, Z. C. Four new prenylated flavonoids, glyasperins A, B, C, and D from the roots of *Glycyrrhiza aspera*. *Heterocycles*, **1992**, *34*, 575–587.

- Seon, M. R.; Lim, S. S.; Choi, H. J.; Park, S. Y.; Cho, H. J.; Kim, J. K.; Park, J. H. Y.). Isoangustone A present in hexane/ethanol extract of Glycyrrhiza uralensis induces apoptosis in DU145 human prostate cancer cells via the activation of DR4 and intrinsic apoptosis pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, *54*, 1329–1339.
- 66. Whalley, J. L.; Bond, T. J.; Botting, N. P. Synthesis of ¹³C labelled daidzein and formononetin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2569–2572.
- 67. Tomoyoshi, A. Diversity of enzymes in isoflavonoid pathway Key words: isoflavonoid; P450; phytoalexin; prenyltransferase; soybean. **2011**, 1–6.
- McNaught, A. D.; Wilkinson, A. conjugated system (conjugation) IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). *Blackwell Scientific Publications* 1997, ISBN 0-9678550-9-8.

参考論文と学会発表

1. 参加論文

- Structures of two new flavonoids and effects of licorice phenolics on vancomycinresistant *Enterococcus* species.
 <u>Eerdunbayaer</u>, Orabi M A, Aoyama H, Kuroda T, Hatano T. *Molecules 19*, 3883–3897 (2014) IF: 2.428.
 Structures of new phenolics isolated from licorice, and the effectiveness of licorice
- 2) Structures of new phenolics isolated from inconce, and the effectiveness of inconce phenolics on vancomycin-resistant *Enterococci*.
 <u>Eerdunbayaer</u>, Orabi M A, Aoyama H, Kuroda T, Hatano T.
 Molecules 19, 13027–13041 (**2014**) IF: 2.428.
- 2. その他の論文
- Polyphenolic constituents of *Cynomorium songaricum* Rupr. and antibacterial effect of polymeric proanthocyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Jin S, <u>Eerdunbayaer</u>, Doi A, Kuroda T, Zhang G, Hatano T, Chen G. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7297–7305 (2012)
- Hydrolysable tannins isolated from *Syzygium aromaticum*: Structure of a new Cglucosidic ellagitannin and spectral features of tannins with a tergalloyl group. Bao L-M, <u>Eerdunbayaer</u>, Nozaki A, Takahashi E, Okamoto K, Ito H, Hatano T. *Heterocycles*, 85, 365–381 (2012)
- 3. 口頭発表
- Nitraria sibrica の成分と関連化合物による MRSA が示すノルフロキサシン耐性に対する作用
 Zhang Guixia, Jin Shangwu, Chen Guilin, <u>Eerdunbayaer</u>, Bao Li-Ming, 黒田照夫, 伊東秀之, 波多野力
 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月, 千葉
- 2) 東北甘草の成分研究

Eerdunbayaer, 青山弘枝, 黒田照夫, 波多野力 日本生薬学会第 60 回年会 2013 年 9 月, 札幌

- 1. kaempferol-3-*O*-methyl ether
- 2. kaempferol
- 3. isolicoflavonol
- 4. 6"-*O*-acetylliquiritin
- 5. liquiritin
- 6. liquiritigenin
- 7. isoliquiritin
- 8. allolicoisoflavone B
- 9. formononetin
- 10. semilicoisoflavone B
- 11. 5,7-di-*O*-methylluteone
- 12. glycyrrhiza-isofavone B
- 13. glycyrrhizaisofavone
- 14. 7-*O*-methylluteone
- 15. $8-(\gamma,\gamma-dimethylallyl)$ -wighteone
- 16. gancaonin G
- 17. isoangustone A
- 18. 6,8-diprenylorobol
- 19. glicoricone
- 20. licoricone
- 21. glyasperin D
- 22. glyasperin J
- 23. glyasperin J trimethyl ether
- 24. glyasperin C
- 25. licoricidin
- 26. 3'-(γ , γ -dimethylallyl)-kievitone
- 27. licopyranocoumarin
- 28. isoglycycoumarin
- 29. licoarylcoumarin
- 30. glycyrin

- 31. glycycoumarin
- 32. demethylhomopterocarpan
- 33. glycyrol
- 34. isoglycyrol
- 35. demethylglycyrol
- 36. gancaonin I
- 37. licocoumarone
- 38. glycybenzofuran
- 39. 4'-*O*-methylglycybenzofuran
- 40. neoglycybenzofuran
- 41. licoriphenone
- 42. *p*-hydroxybenzoic acid
- 43. 3-(*p*-hydroxyphenyl)-7-methoxycoumarin
- 44. 1-*O*-methylglycyrol
- 45. 1,9-*O*-methylglycyrol
- 46. glycybenzofuran tetrarmethyl ether
- 47. demethylglycycoumarin