

博士學位論文

内容の要旨
および
審査の結果の要旨

薬学研究科

第42号

令和元年11月

徳島文理大学

は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

目 次

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
乙第47号	NINH THE SON	Studies on Biologically Active Secondary Metabolites from Some Medicinal Plants in Viet Nam	1

氏名	ニン テ ソン NINH THE SON
本籍	ベトナム
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	乙第47号 (論文博士)
学位授与年月日	令和元年9月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当 (論文博士)
学位論文の題目	Studies on Biologically Active Secondary Metabolites from Some Medicinal Plants in Viet Nam
論文審査委員	(主査) 教授 福山 愛保 (副査) 教授 浅川 義範 (副査) 教授 梅山 明美 (副査) 准教授 Nguyen Manh Cuong (Vietnam Academy of Science and Technology)

Studies on Biologically Active Secondary Metabolites from Some Medicinal Plants in Viet Nam

NINH THE SON

For thousands of years, Vietnamese traditional herbal medicine, also known as Southern Medicine, has been used to treat various diseases. Historical medical documents have shown that the Vietnamese people as well as other ethnic groups treated diseases with available resources, such as herbs and plants containing medicinal properties. To this end, the search for bioactive molecules from natural products has been of biomedical interest as a source of novel pharmacological agents. Recently, modern chromatography techniques have been applied to isolate numerous secondary metabolites containing biological activity. This platform has allowed for the discovery of new potential drug candidates.

The present work formed the basis for my dissertation, titled “**Studies on Biologically Active Secondary Metabolites from Some Medicinal Plants in Viet Nam.**” This work encompasses phytochemical, spectroscopic, and biological studies to identify novel metabolites which may be potential therapeutics. This study deals with two Vietnamese medicinal plants: *Dalbergia tonkinensis* Prain (*D. tonkinensis*) and *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer in Hook (*C. formosum*). Of pharmacological interest, the *D. tonkinensis* species is recognized to be a potential agent in treating diabetes. Leaves from the *C. formosum* species have traditionally been employed for tea and heat detoxification, while also containing digestive benefits and anti-aging properties. As the chemical components of this plant are rich in tannins and flavonoids, the biological activity of *C. formosum* species includes significant antioxidant properties. Though these two plants have played an important role in Vietnam, to date, specific phytochemical investigations on these plants have been limited. In order to explore further scientific aspects on these plants, the present work has focused on elucidating new kinds of biological activities from several parts of these two plants, including plant

extracts and natural compounds. The results have been divided into the following chapters:

Chapter 1 An overview of studies on *Dalbergia* genus:

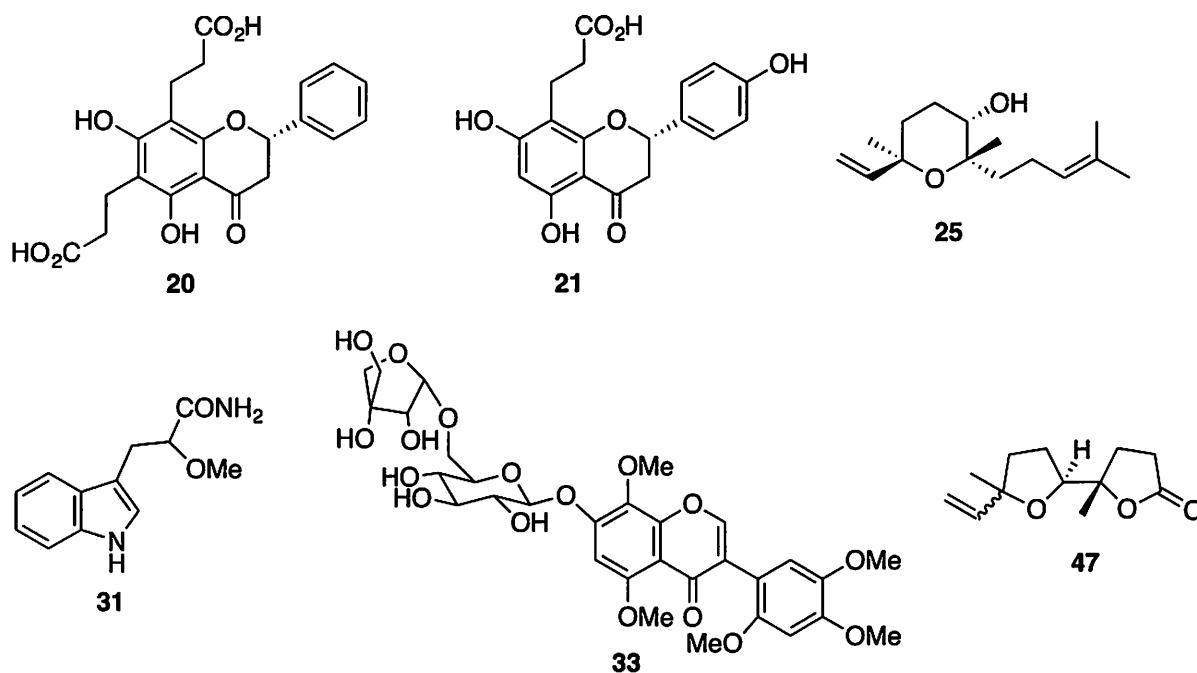
It is necessary to demonstrate a broad spectrum of the previous studies relating to the plants from the *Dalbergia* species. Consequently, this chapter deals with an overview of the botanical description, traditional uses, phytochemical investigations, and pharmacological activities of this plant. Most of the *Dalbergia* species are environmentally protected due to over-exploitation. *D. tonkinensis* is on the IUCN Red List of Threatened Species and Vietnam Government Decree No, 32/2016/ND-CP, prohibiting the exploitation, shipping, and storage of this tree. Chemically, the perennial plants from *Dalbergia* genus are rich in flavonoids and glycosides. Thus, pharmacological outcomes arising from *in vitro* and *in vivo* studies provide evidence for employing *Dalbergia* plants as potential pharmacological agents for bacterial infections, diabetes, cancer, cardiac failure, and so on.

Chapter 2 Chemical constituents from *Dalbergia tonkinensis* Prain:

In this chapter, the experimental design mainly focused on the phytochemical investigations on heartwood, leaf, and root of the Vietnamese *D. tonkinensis* plant. Briefly, the first stage involved producing the crude extracts obtained by using methanol or ethanol solvents. These crude extracts were partitioned with other solvents including *n*-hexane, chloroform, dichloromethane, and ethyl acetate. Utilizing silica gel, Sephadex, RP-18 and high-performance liquid chromatography (HPLC) columns in multi-chromatographical actions, a total of 47 compounds were isolated. Among them, two new rare flavanone derivatives (2*S*)-6,8-dicarboxyethylpinocembrin (**20**), and (2*S*)-8-carboxyethylnaringenin (**21**) and one new sesquiterpene *rel*-(3*R*,6*S*,7*S*)-6 α -hydroxycyclonerolidol (**25**) were isolated from heartwood, while one new alkaloid 3-(1*H*-indol-3-yl)-2-methoxypropanamide (**31**) and one new isoflavone glycoside isocaviunin 7-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (**33**) were identified in the leaf. In addition, a new sesquiterpene 2,5'-dimethyl-5'-vinylhexahydro-2,2'-bifuran-5(2*H*)-one (**47**) was found in the root.

The results also suggested that flavonoids and flavonoid glycosides predominated in the *D. tonkinensis* plant. Of particular interest, among secondary metabolites, sesquiterpene nerolidol derivatives were only found in Vietnamese *D.*

tonkinensis and Chinese *D. odorifera*, thereby marking a close affinity between these plants.



Chapter 3 Chemical constituents from *Cratoxylum formosum*:

Phytochemical studies on *C. formosum* led to the isolation of nine compounds from the methanol extract of the leaf. Isolated compounds were categorized as phytosterols, xanthone glycosides, flavonoids, and flavonoid glycosides.

Chapter 4 Biological activities:

In the present study, several kinds of extracts, fractions, and isolated compounds from the plants of *Dalbergia* genus were investigated for biological activity. Antimicrobial, enzymatic, and antioxidant activity assays were carried out. *D. tonkinensis* methanol extracts of leaf, stem bark and root, and chloroform fractions of heartwood methanol extract caused more than 60% bacterial growth inhibition against *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Among the isolated compounds, flavanone pinocembrin and isoflavone biochanin A suppressed 80% of the bacterial growth of the two strains *B. cereus* and *S. pneumoniae* compared with the positive control. Likewise, 80% growth inhibition of *S. pneumoniae* was caused by the isoflavanone sativanone and chalcone isoliquiritigenin.

The products from *D. tonkinensis* (extracts, fractions, and isolated compounds) were assessed for enzymatic activity assays. The results suggest that at concentrations of 25-250 ng/mL, the methanol extracts of leaf and root, the root ethanol extract and its dichloromethane fraction, and heartwood water decoction extract can serve as useful sources to stimulate trypsin enzymatic activity. In addition, water decoction extracts of leaf and stem bark may explain unknown ethno-pharmacology due to the high inhibitory percentages in trypsin-chymotrypsin-elastase experiments. Among the isolated compounds, quercetin inhibited the activities of trypsin and chymotrypsin with an IC₅₀ value of 9.7 μM.

Finally, for antioxidant evaluation, we found that the isoflavan 3*R*-vestitol (from *D. tonkinensis*) and isoquercetin (from *C. formosum*) possessed free radical scavenging activity in a similar fashion as the standard compound catechin (IC₅₀ 42.98 μg/mL).

論文審査結果の要旨

本論文は、2種のベトナム産植物 *Dalbergia tonkinensis* Prain と *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer in Hook の植物化学的研究と生理活性の検討及び構造活性相関に関する天然物化学研究成果からなる。

ベトナムの伝統医薬は古くから様々な疾患に対し薬用植物が使用されてきた。古い医学書によるとベトナム人だけでなく他民族もハーブや薬草を病気の治療に用いていた。このように、ベトナム産薬用植物が新規な薬物の探索資源として注目されている。さらに、精製技術が飛躍的に進歩したことから微量の生理活性物質の単離は迅速且つ容易になり、複雑な植物混合成分から新規生理活成分の発見が相次いでいる。

このような観点から、著者は、ベトナム産 *D. tonkinensis* と *C. formosum* に着目した。*D. tonkinensis* は糖尿病の治療に、また *C. formosum* は解熱剤に使用されている薬用植物である。特に、両植物とも抗老化作用が期待されていることは興味深い。*D. tonkinensis* の成分研究の結果、47個の化合物が単離できた。その内、6個の新規化合物はフラバノン **20**、**21**、セスキテルペン **25**、**47**、アルカロイド **31**、イソフラボングリコサイド **33** で、それらの相対構造及び絶対構造は2次元 NMR、MS データーおよび CD スペクトルの解析により決定した。特に、carboxyethyl 基を有するフラバノン **20** と **21** は珍しい化合物と見なせることから、生合成の解明が今後の課題である。一方、*C. formosum* からは9個の化合物が単離同定できたが、新規物質は見いだせなかった。今回、単離された化合物と発表文献データに基づき、*Dalbergia* 属植物間の植物化学的特徴を検討した結果、フラバノン **20** と **21** が *Dalbergia* 属植物分類に重要な化学的指標であることが提示できた。

D. tonkinensis と *C. formosum* から単離された化合物及び両植物の部位（葉、根、心材、樹皮）毎の抽出物について3種の生理活性（抗菌活性、セリンプロテアーゼ活性、DPPH ラジカル消去活性）を検討した。その結果、イソフラボン sativanone、カルコン isoliquirtigenin が *Streptococcus pneumoniae* に対して強い抗菌活性を示し、*D. tonkinensis* 心材のメタノール抽出クロロホルム分画が *Bacillus cereus*、*Escherichia coli*、*S. pneumoniae* に対し抗菌活性を有することが分かった。一方、化合物の中で quercetin が trypsin と chemotrypsin 活性を強力に阻害した (IC₅₀ 9.7μM)。また、*D. tonkinensis* 抽出物には trypsin 活性を活性化する興味深い作用が見いだされた。さらに、DPPH ラジカル消去活性において、*D. tonkinensis*

から単離されたイソフラボン 3*R*-vestitol と *C. formosum* から単離された isoquercetin に標準サンプル catechin と同等の活性を見いだした。最後に、3種の活性に関して構造活性相関も検討し、活性に必要な官能基と結合位置についての知見も提案することができた。

本論文は、2種のベトナム産植物 *D. tonkinensis* と *C. formosum* の成分研究から合計 56 個の化合物を単離同定し、その内 6 個が新規化合物であり、それらの構造を機器分析データの解析により明らかにした。さらに、今回の研究で得た化合物データに基づき *Dalbergia* 属の植物化学的解析も実施し、*Dalbergia* に特有の化学的特徴を提示した。また、3種の生理活性を検討し、単離したフラボン類の中に今後の研究が期待できる化合物並びに新規の活性成分の発見が予想できる *D. tonkinensis* の部位も明らかにできた。

以上、従来の天然物化学研究に加え生理活性手法を積極的に導入したベトナム薬用植物の付加価値を高める独創的な本研究は、博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員 （主査） 教授 福山 愛保

（副査） 教授 浅川 義範

（副査） 教授 梅山 明美

（副査） 准教授 Nguyen Manh Cuong

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第42号)

令和元年11月 発行

編集・発行

徳島文理大学大学院薬学研究科
徳島市山城町西浜傍示180
〒770-8514 TEL 088-602-8210

印刷

原田印刷出版株式会社
徳島市西大工町4丁目5
〒770-0903 TEL 088-622-2356
FAX 088-622-2357
E-mail: haradapp@khf.biglobe.ne.jp