

Flavan-3-ol 類の位置選択的修飾法の開発

Development of regioselective modification method of flavan-3-ols

東野雄祐*, 法島太一*, 森一起*, 岡本泰輔*, 中島範行**, 齊藤安貴*

Yusuke Higashino*, Taichi Hojima*, Kazuki Mori*, Taisuke Okamoto*,
Noriyuki Nakajima**, Akiko Saito*

Abstract

There is currently great interest in the investigation of flavan-3-ols from food sources that have strong biological activities, as these compounds are generally considered highly safe because we take them as a part of food in daily diet. However, the structure–activity–relationships (SARs) of flavan-3-ols are not well understood because they are obtained as a mixture of various analogs in many cases, which makes purification difficult.

So, we developed regioselective modification method of flavan-3-ols. Recently we reported a new synthesis strategy of galloyl group modified flavan-3-ols by regioselective deprotection at 5-position. Here we demonstrated the details of the reaction conditions of our method and recent further investigation.

1. はじめに

Flavan-3-ol とは、ポリフェノール化合物の一種で様々な植物中で生産される二次代謝産物である^{1, 2)}。特に食品となる作物中に大量に含まれており、我々は日々食事の一部として体内に取り入れ続けている。近年、食による健康維持が注目され様々な研究が行われると同時に、様々なサプリメントなどの健康食品が市販されている。Flavan-3-ol も多くの健康食品に含まれており、その高機能性は高く評価されている。例えばお茶カテキンの主成分は、(-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) (**1**) (Fig. 1) と呼ばれ、様々な健康効果を持つことが化学的に証明されており、それを含む食品や添加した飲料が一般的にも受け入れられている。一方で、食品に大量に含まれる EGCG (**1**) のような化合物は強い生物活性を持たないことが多く、むしろそれらと同時に摂取する微量成分に強い活性があることが我々の研究からも示唆されている。食品中には微量成分として様々な flavan-3-ol 誘導体が含まれているが、その構造や機能は明らかにされていない。その理由として、多くのフェノール性水酸基のため、flavan-3-ol 誘導体の化合物としての性質はどれも類似しており、化合物の性質を利用して分離するクロマトグラフィーなどの化学的な手法では分離が困難であることがあげられる。食品に含まれる flavan-3-ol 誘導体の有効利用や機能解明のためには、それぞれの化合物を純粋に入手しなければならず、それゆえ我々は、必要な化合物を一から組み立てることが可能な有機合成の

* 大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻

** 富山県立大学工学部生物工学科

手法が最も適していると考え検討を進めている。

我々はこれまでに、市販されている **1~3** (Fig. 1) を用いて flavan-3-ol 重合体の合成を行い、それらの詳細な構造-活性相関研究を進めている³⁻¹⁰。Flavan-3-ol 重合体はプロアントシアニジンと呼ばれ、様々な高い生物活性が報告されている^{11,12} (Fig. 2)。高機能性化合物として一般にも知られ、ブドウやラズベリーなどの果実には単量体よりもむしろ多く含まれていることから、ブドウポリフェノールやワインポリフェノールと呼ばれることも多い。プロアントシアニジンの主な生物活性としては、抗菌活性¹³、抗ウイルス活性¹⁴⁻¹⁷、抗炎症活性^{18,19}、抗ガン活性²⁰⁻²³、抗血管新生活性²⁴、神経疾患予防²⁵、心疾患予防²⁶が知られている。我々は、プロアントシアニジンがどのように活性を発揮するのかを調べるため、様々な類縁体を合成し、それらの活性の探索を行っている。

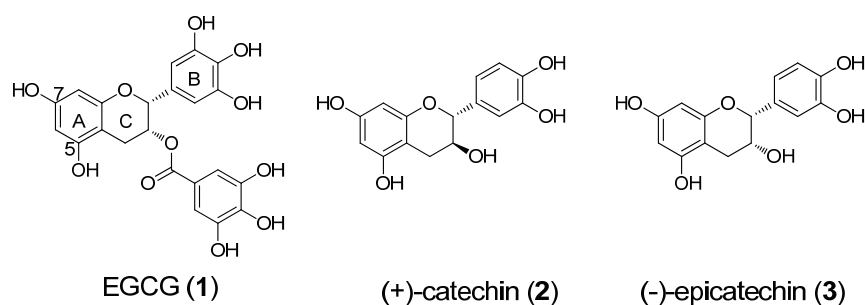


Figure 1. 我々が原料として用いている市販の flavan-3-ol 類

詳細な構造-活性相関研究のためのプロアントシアニジン合成では、flavan-3-ol ユニットを縮合させる方法で行う。ゆえに、様々な化合物を合成するためには、単量体である flavan-3-ol をあらかじめ必要な官能基で修飾しておく必要がある。また、食品中にも flavan-3-ol の水酸基がエーテル基やエステル基で修飾された二次代謝産物が多く含まれることから、食品中の flavan-3-ol 類の機能を解明するためには、水酸基の効率的・選択的な修飾方法が必要となる。しかし、**1~3** (Fig. 1) の構造からわかるように、類似の環境にあるフェノール性水酸基が多数存在する。そのため特に A 環上の 5, 7 位の水酸基を区別して修飾可能な手法は報告されていなかった。そこで我々は、A 環上の 5 位, 7 位をそれぞれ選択的に修飾できる新たな手法の開発を目指して検討を進めた。その結果、**1~3** の 5, 7 位の反応性の違いを利用した新規脱保護法を見出した。その手法を用いることで位置選択的な修飾を行うことが可能となり、ごく最近、(+)-catechin (**2**) や(-)-epicatechin (**3**) の 5 位を選択的にガロイル基で修飾した初の選択的合成を行い、学術論文として受理された²⁷。ここでは、論文に記載しなかった、脱保護法の詳細な条件検討、および、その後見出した 7 位の脱保護に関して詳細を述べる。

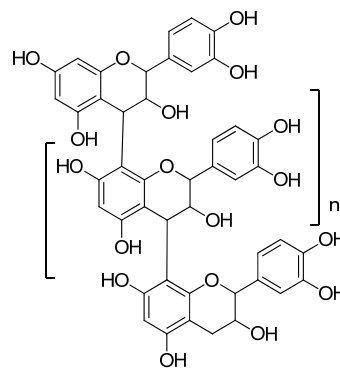
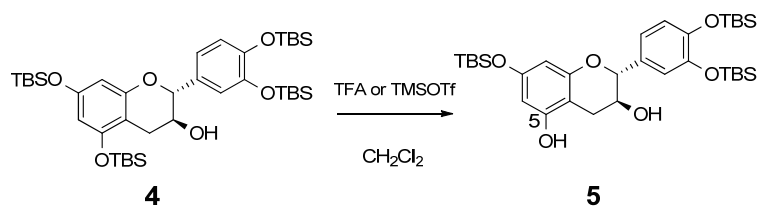


Figure 2. Flavan-3-ol 重合体の構造

2. Flavan-3-ol TBS 保護体の位置選択的脱保護法の開発

2.1 酸触媒による 5 位 TBS 選択的脱保護

前述のように, flavan-3-ol の A 環上の 2 つの水酸基は似た環境にあり, それぞれの水酸基を区別して選択的に修飾することができなかつた. 様々な検討を行った結果, (+)-catechin (**2**) のフェノール性水酸基を TBS 保護した **4**²⁸⁾ を, 酸処理することで 5 位を位置選択的に脱保護した **5** を得ることができた. そこで, 様々な酸性条件で検討を行った. 酸として用いた主なものは, 塩酸, リン酸, 酢酸, ギ酸, *p*-トルエンスルホン酸, トリフルオロ酢酸 (TFA), カルボン酸修飾シリカゲル, トリフルオロメタンスルホン酸 (TMSOTf), 四塩化チタン, 四塩化スズである. この中で, 脱保護が進行したのは, TFA, および, TMSOTf であった (Scheme 1). 詳細な NMR による構造解析の結果, TFA, 及び, TMSOTf を作用させ得られた化合物は同じ構造を持ち, HMQC, HMBC, ROESY 解析の結果から, 脱保護位置は 5 位であることが確認された.



Scheme 1. 5 位選択的脱保護

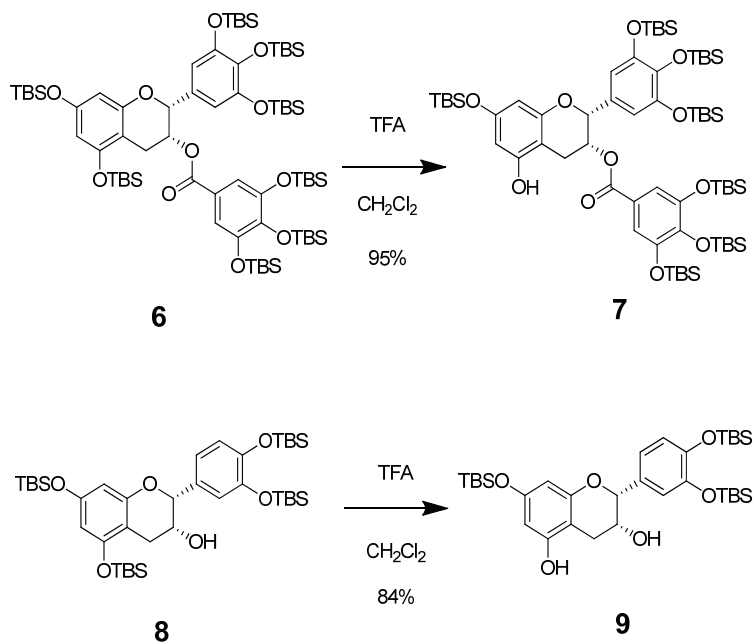
次に TFA を用いて溶媒効果を確認した. 非極性溶媒として, ジクロロメタン, クロロホルム, 四塩化炭素, ベンゼン, トルエン, 極性溶媒としてテトラヒドロフラン, ジエチルエーテル, 1,4-ジオキサン, メタノールを用いた. その結果を Table 1 に示した. 非極性溶媒では比較的反応が速やかに進行し, 特にジクロロメタン溶媒で反応させた場合の収率が最も高く, 90%であった. 極性溶媒であるエーテル系の溶媒を用いた場合では反応が進行しなかつた. これはエーテル酸素原子の非共有電子対が TFA の反応を阻害したものと考えている. 以下の結果から 5 位を TBS 基で保護した flavan-3-ol を TFA で脱保護する場合, 非極性溶媒を用いることにした.

Table 1. TFA を用いた脱保護検討

4		TFA or TMSOTf	5	
		CH ₂ Cl ₂		
		90%		
	TFA の等量	温度	収率 (%)	
ジクロロメタン	1.2	0 °C→rt	90	
クロロホルム	2	rt	50	
四塩化炭素	2	rt	66	
ベンゼン	2	rt	20	
トルエン	2	rt	72	
テトラヒドロフラン	2	rt	NR	
ジエチルエーテル	2	rt	NR	
1,4-ジオキサン	2	rt	NR	
メタノール	2	rt	NR	

eq: equivalent; rt: room temperature; NR: no reaction

この反応が一般性を持つか否かを確認した。TBS 基で保護した EGCG (**6**), (-)-epicatechin (**8**)²⁷⁾を出発原料として、TFA を触媒として脱保護を確認した。両基質とも反応は速やかに進行し、5 位脱保護体 **7**, **9** をそれぞれ、95 %, 84 % で得る事ができた。今回見出した脱保護反応は、flavan-3-ol 類に広く使用できる可能性が示唆された。



Scheme 2. 反応の一般性の確認

これらの反応で得られた化合物 **5**, **9** を用いて、天然物の合成研究を行った。お茶などの微量成分として3,5位がガロイル基で修飾された flavan-3-ol 誘導体 **10**²⁹⁾, **11**³⁰⁾が報告されている (Fig. 3) . 化合物 **5**, **9** を用いることで、これらの化合物を効率的に合成可能だと考えた。また、これらの選択的合成法はこれまでに報告例がないことから、学術的な価値も大きい。検討の結果 **10**, **11** の合成に成功し、子宮頸ガン細胞である HeLa S3 細胞を用いた細胞増殖抑制試験を行ったところ、3 位の立体が異なる異性体の内、**11** のみが強い活性を示すことが確認された。一般的にガロイル基によって修飾を受けた化合物は生物活性が向上することが知られているが、このように1か所の立体が異なるだけの類縁体において大きく活性が異なる例は知られておらず、学術論文として投稿した

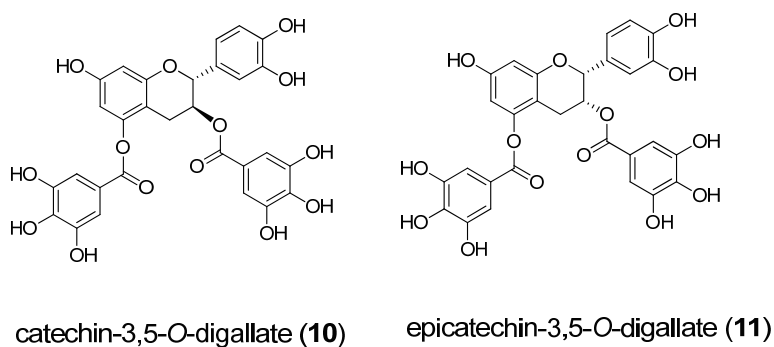


Figure 3. 新規脱保護法を用いて合成した天然物

2.2 塩基触媒による7位脱保護体の確認

前述のように、酸触媒による TBS 基で保護した flavan-3-ol (**4**, **6**, **8**)の位置選択的脱保護法を見出すことができた。その後様々な検討を行ったところ、塩基性条件下においても TBS 基の脱保護が進行することを確認した。様々な塩基と溶媒を用いて検討を行った。塩基は炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、トリエチルアミン、*N*-エチルジイソプロピルアミンである。その結果ジクロロメタン-メタノール混合溶媒中、炭酸カリウム、室温で処理すると7位、あるいは5位のどちらかの TBS 基が脱保護されることがわかった。両方の TBS 基が脱保護されたものは確認されていないことからどちらかの TBS 基が脱保護された場合、もう片方の TBS の反応性が低下することが考えられた。Table 2 は、4 等量の炭酸カリウムを用い、溶媒の条件検討を行ったものである。ジクロロメタンとメタノールが 1:4 の混合溶媒中でのみ反応が進行していることが確認された。

このように7位の TBS 基のみを脱保護した報告例は現在までになく、現在さらなる収率や選択性の向上を目指し検討を進めているところである。

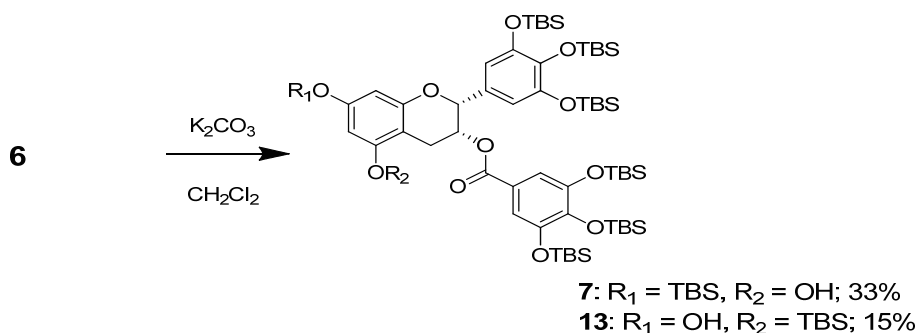
Table 2. 塩基触媒による TBS 基の脱保護検討



	5	12
ジクロロメタン-メタノール	45%	30%
ジクロロメタン-テトラヒドロフラン	NR	NR
ジクロロメタン-2-エトキシエタノール	NR	NR
ジクロロメタン-1,4-ジオキサン	NR	NR
ジクロロメタン-ジエチルエーテル	NR	NR

*溶媒の混合比率はすべて 1:4 である

本反応の一般性を確認するため、化合物 **6** を用いて検討を行ったところ同様に脱保護が進行した。解析を行ったところ同様に5位または7位が脱保護された化合物をそれぞれ 33%、15%の収率で得ることができた (Scheme 3)。



Scheme 3. 塩基を用いた TBSEGCg の脱保護検討

3. 実験の部

全ての合成反応はアルゴン雰囲気下で行い，反応進行の確認はメルク社の 0.25 mm シリカゲルプレート 60F₂₅₄ Art 5715 の薄層クロマトグラフィーを使用した。シリカゲルクロマトグラフィーは、関東化学株式会社 SilicaGel 60N (spherical, neutral) 63-210 nm を用い，分取用薄層クロマトグラフィーはメルク社の 0.5 mm シリカゲルプレート 60F₂₅₄Art 5477 を用いた。合成に用いた試薬，溶媒は，全て特級のグレードを使用した。スペクトル測定は以下の機器を使用した。¹H 核磁気共鳴スペクトルは Agilent DD2 NMR (400 MHz) を使用した。NMR 測定は CDCl₃ 中で行った。質量スペクトルは，JEOL JMS-AX500 を使用した。

3',4',7-tri(*t*-butyldimethylsilyloxy)-(+)-catechin (5)

化合物 4 (107.4 mg, 0.14 mmol) をジクロロメタンに溶解し，氷冷した。TFA (1.2 eq, 13 μl, 0.17 mmol) を加え攪拌し，飽和重曹水を加えクロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後，減圧濃縮しシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt, 10/1 ~ 2/1) で精製し，化合物 5 (81.7 mg, 90%) を得た。

$[\alpha]_D^{24} = +87.6$ (*c* 1.14, CHCl₃); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 6.93 (1H, br), 6.89 (2H, br), 6.15 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 6.00 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 5.61 (1H, br, OH), 4.73 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 4.08 (1H, ddd, *J* = 5.5, 7.0, 8.5 Hz), 2.96 (1H, dd, *J* = 5.5, 16.0 Hz), 2.66 (1H, dd, *J* = 8.5, 16.0 Hz), 2.09 (1H, br), 1.03 (9H, s), 1.00 (9H, s), 0.99 (9H, s), 0.25 (3H, s), 0.24 (3H, s), 0.22 (6H, s), 0.21 (3H, s), 0.20 (3H, s). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 155.60, 155.58, 155.1, 147.5, 147.4, 131.1, 121.5, 120.3, 120.0, 101.1, 100.85, 100.79, 81.3, 68.5, 26.9, FABMS (*m/z*) 634 (20), 633 ([M+H]⁺, 43), 632 (27), 368 (32), 367 (100); HRFABMS: *m/z* Calculated for C₃₃H₅₇O₆Si₃; 633.3463 Found; 633.3447.

3',4',5',7-tetra(*t*-butyldimethylsilyloxy)-(-)-epigallocatechin-3-*O*-(tri-*O*-*t*-butyldimethylsilyloxy)gallate (7)

化合物 6 (174.2 mg, 0.13 mmol) をジクロロメタンに溶解し，氷冷した。TFA (5eq, 51 μl, 0.67 mmol) を加え攪拌し飽和重曹水を加えクロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後，減圧濃縮し，シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt, 20/1 ~ 10/1) で精製し，化合

物 **7** (153 mg, 0.13 mmol, 95%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), 7.02 (2H, s), 6.56 (2H, s), 6.11 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.94 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.59 – 5.56 (1H, m), 5.00 (1H, s), 5.53 (1H, s), 2.96 – 2.84 (2H, m), 0.95 (9H, s), 0.93 (9H), 0.92 (9H, s), 0.85 (18H, s), 0.84 (18H, s), 0.17 (3H, s), 0.11 (6H, s), 0.10 (6H, s), 0.087 (6H, s), 0.076 (9H, s), 0.069 (6H, s), 0.063 (3H, s), 0.045 (3H, s).

3',4',5-tri(*t*-butyldimethylsilyloxy)-(+)-catechin (12**)**

化合物 **4** (717 mg, 1.1 mmol) をジクロロメタン 5 mL とメタノール 20 ml に溶解した。 K_2CO_3 (4 eq. 138 mg, 4.4 mmol) を加え攪拌し、反応終了を確認したのち飽和塩化アンモン水を加えクロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮しシリカゲルカラムクロマトグラフイー (*n*-hexane/AcOEt, 15/1 ~ 3/1) で精製し、化合物 **12** (200 mg, 0.31 mmol, 30%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 6.86 (1H, s), 6.83 (2H, br), 6.05 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.00 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 4.64 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 3.98 (1H, m), 2.90 (1H, dd, $J = 5.4, 16.0$ Hz), 2.54 (1H, dd, $J = 8.2, 16.0$ Hz), 0.97 (18H, s), 0.94 (9H, s), 0.22 (3H, s), 0.21 (3H, s), 0.19 (3H, s), 0.18 (3H, s), 0.14 (3H, s), 0.13 (3H, s).

3',4',5',5-tetra(*t*-butyldimethylsilyloxy)-(-)-epigallocatechin-3-*O*-(tri-*O*-*t*-butyldimethylsilyloxy)gallate (13**)**

化合物 **6** (673 mg, 0.48 mmol) をジクロロメタン 5 mL とメタノール 7 ml に溶解し K_2CO_3 (2 eq. 188 mg, 0.96 mmol) を加え攪拌し、反応終了を確認したのち飽和塩化アンモン水を加えクロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフイー (*n*-hexane/AcOEt, 50/1 ~ 30/1) で精製し化合物 **13** (92 mg, 0.07 mmol, 15%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 7.02 (2H, s), 6.56 (2H, s), 6.11 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.94 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.59 – 5.56 (1H, m), 5.00 (1H, s), 5.53 (1H, s), 2.96 – 2.84 (2H, m), 0.95 (9H, s), 0.93 (9H, s), 0.92 (9H, s), 0.85 (18H, s), 0.84 (18H, s), 0.17 (3H, s), 0.11 (6H, s), 0.10 (6H, s), 0.087 (6H, s), 0.076 (9H, s), 0.069 (6H, s), 0.063 (3H, s), 0.045 (3H, s).

4. まとめ

今回 flavan-3-ol の TBS 保護体の A 環上 5 位, または 7 位の保護基それぞれを脱保護できる条件を見出した。詳細な検討の結果, 酸と塩基を使い分けるといった簡単な手法で汎用性があることも確認した。このような位置選択的脱保護の例はなく, 新たな flavan-3-ol 誘導体の合成が可能になることから, 構造-活性相関研究の効率化が期待できる。現在, さらなる収率の向上やこれらを発展させた合成を進め, 学術論文としてまとめる準備を進めている。

謝辞

本研究は, 農林水産省・農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業, (公財) 飯島藤十郎記念食品科学振興財団学術研究助成, 大阪電気通信大学共同研究費 A の助成を受けて実施いたしました。この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- [1] J. B. Harborne "The Flavonoids: Advances in research from 1986. ", Chapman and Hall: London (1993) .
- [2] J. B. Harborne, H. Baxter, "Handbook of Natural Flavonoids. The Handbook of Natural Flavonoids. ", John Wiley & Sons, NY (1999).
- [3] A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, "Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 4. The synthesis of procyanidin B1 and B4. TMSOTf-catalyzed cyclization of catechin and epicatechin condensation.", *Heterocycles*, **61**, 287-298 (2003).
- [4] A. Saito, A. Tanaka, M. Ubukata, N. Nakajima, "Stereoselection of 3,4-*cis* and 3,4-*trans* catechin and catechin condensation under intramolecular coupling method.", *Synlett*, 2040-2042 (2004).
- [5] A. Saito, M. Emoto, A. Tanaka, Y. Doi, K. Shoji, Y. Mizushima, H. Ikawa, H. Yoshida, N. Matsuura, N. Nakajima "Stereoselective synthesis of procyanidin B3,3-*O*-gallate and 3,3'-*di-O*-gallate, and their abilities as antioxidant and DNA polymerase inhibitor. ", *Tetrahedron*, **60**, 12043-12049 (2004).
- [6] A. Saito, Y. Mizushima, H. Ikawa, H. Yoshida, Y. Doi, A. Tanaka, N. Nakajima, "Systematic synthesis of galloyl-substituted procyanidin B1 and B2, and their ability of DPPH radical scavenging activity and inhibitory activity of DNA polymerases.", *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 2759-2771 (2005).
- [7] H. Sakuda, A. Saito, Y. Mizushima, H. Ikawa, H. Yoshida, A. Tanaka, N. Nakajima, "Synthesis of galloyl-substituted procyanidin B4 Series, and their DPPH radical scavenging activity and DNA polymerase inhibitory activity. ", *Heterocycles*, **67**, 175-188 (2006).
- [8] A. Saito, Y. Mizushima, A. Tanaka, N. Nakajima, "Versatile synthesis of epicatechin series procyanidin oligomers, and their antioxidant and DNA polymerase inhibitory activity.", *Tetrahedron*, **65**, 7422-7428 (2009).
- [9] S. Okamoto, S. Ishihara, T. Okamoto, S. Doi, K. Harui, Y. Higashino, T. Kawasaki, N. Nakajima, A. Saito, "Inhibitory activity of synthesized acetylated procyanidin B1 analogues against HeLa S3 cells proliferation.", *Molecules*, **19**, 1775-1785 (2014).
- [10] S. Ishihara, S. Doi, K. Harui, T. Okamoto, S. Okamoto, J. Uenishi, T. Kawasaki, N. Nakajima, A. Saito, "Development of a new synthetic strategy for procyanidin dimer condensation using peracetylated electrophiles.", *Heterocycles*, **88**, 1595-1602 (2014).
- [11] 片岡茂博, 有賀敏明, "赤ワインの有効成分プロアントシアニジン なぜ赤ワインが体によいのか.", *ファルマシア*, **34**, 998-1002 (1998)
- [12] 有賀敏明, 細山浩, 徳武昌一, 山越純, "プロアントシアニジンの機能性解明と開発", *日本農芸化学会誌*, **74**, 1-8 (2000).
- [13] H. Kolodziej, O. Kayser, K. P. Latt, D. Ferreira, "Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method.", *Planta Med.* **65**, 444-446 (1999).
- [14] Y. Atsuzawa, M. Kusuhata, Y. Yoshinaka, A. K. Saito, N. Yamamoto, S. Yamaoka, JP Patent, 2014-097204.
- [15] L. Chandrasekaran, K. Ichiyama, V. F. Chen, A. Saito, Y. Yoshinaka, N. Yamamoto, "In Silico study verifying antiviral activity of proanthocyanidins with special reference to dengue virus.", *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery*, **3**, 317-338 (2014).
- [16] A. Derksen, A. Hensel, W. Hafezi, F. Herrmann, T. J. Schmidt, C. Ehrhardt, S. Ludwig, J. Kühn, "3-*O*-Galloylated procyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of influenza A virus.", *Plos One*, **9**, e11089 (2014).
- [17] Y. Ishida, M. Takeshita, H. Kataoka, "Functional foods effective for hepatitis C: Identification of

- oligomeric proanthocyanidin and its action mechanism.", *World J. Hepatol*, **6**, 870-879 (2004).
- [18] Y. C. Park, G. Rimbach, C. Saliou, G. Valacchi, L. Packer, "Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages.", *FEBS Lett*, **465**, 93-97 (2000).
- [19] J. Y. Jhun, S. J. Moon, B. Y. Yoon, J. K. Byun, E. K. Kim, E. J. Yang, J. H. Ju, Y. S. Hong, J. K. Min, S. H. Park, H. Y. Kim, M. L. Cho, "Grape seed proanthocyanidin extract-mediated regulation of STAT3 proteins contributes to treg differentiation and attenuates inflammation in a murine model of obesity-associated arthritis.", *Plos One*, **8**, e78843 (2013).
- [20] S. Okamoto, S. Ishihara, T. Okamoto, S. Doi, K. Harui, Y. Higashino, T. Kawasaki, N. Nakajima, A. Saito, "Inhibitory activity of synthesized acetylated procyanidin B1 analogs against HeLa S3 cells proliferation.", *Molecules*, **19**, 1775-1785 (2014).
- [21] H. Nomoto, M. Iigo, H. Hamada, S. Kojima, H. Tsuda, "Chemoprevention of colorectal by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis.", *Nutr. Cancer*, **49**, 81-88 (2004).
- [22] A. Tyagi, K. Raina, S. Prakash, P. Shrestha, B. Miller, J. A. Thompson, "Procyanidin B2 3,3'-digallate, a biologically active constituent of grape seed extract, induces apoptosis in human prostate cancer cell via targeting NF- κ B, Stat3, and AP1 transcription factors.", *Nutr. Cancer*, **66**, 736-736 (2014).
- [23] W. Fujii, K. Toda, K. Kawaguchi, S. Kawahara, M. Katoh, Y. Hattori, H. Fujii, H. Makabe, "Syntheses of prodelfinidin B3 and C2, and their antitumor activities through cell cycle arrest and caspase-3 activation.", *Tetrahedron*, **69**, 3543-3550 (2013).
- [24] M. S. Pesca, F. D. Piaz, R. Sanogo, A. Vassallo, M. B. Abreu, A. Rapisarda, P. M. Germano, G. Certo, Falco, N. Tommasi, A. Braca, "Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antiangiogenic activities.", *J. Nat. Prod.*, **76**, 29-35 (2013).
- [25] J. Wang, M. G. Ferruzzi, L. Ho, J. Blount, E. M. Janle, B. Gong, Y. Pan, G. A. N. Gowda, D. Raftery, I. Arriet-Cruz, V. Sharma, B. Cooper, J. Lobo, J. E. Simon, C. Zhang, A. Cheng, X. Qian, K. Ono, D. B. Teplow, C. Pavlides, R. A. Dixon, G. M. Pasinetti, J. "Brain-targeted proanthocyanidin metabolites for alzheimer's disease treatment.", *Neurosci.*, **32**, 5144-5150 (2012).
- [26] C. Z. Wang, S. Mehendale, T. Calway, C. S. Yuan, "Botanical flavonoids on coronary heart disease.", *Am J Chin Med.*, **39**, 661-671 (2011).
- [27] K. Mori, Y. Ayano, Y. Hamada, T. Hojima, R. Tanaka, Y. Higashino, M. Izuno, T. Kawasaki, M. Hamada, N. Nakajima, A. Saito "Role of 2,3-*cis* Structure of (-)-Epicatechin-3,5-*O*-digallate in Inhibition of HeLa S3 Cell Proliferation.", *Nat. Prod. Chem. Res.*, **3**, 172 (2015).
- [28] N. Nakajima, K. Horikawa, N. Takekawa, M. Hamada, T. Kishimoto, "Condensation of catechin and epicatechin incorporating a TBS-protecting group.", *Heterocycles*, **84**, 349-354 (2012).
- [29] M. Roselli, G. Lemtini, S. Habtemariam, "Phytochemical, antioxidant and anti- α -glucosidase activity evaluations of *Bergenia cordifolia*.", *Phytother. Res.*, **26**, 908-914 (2012).
- [30] H. J. Kim, J. Y. Lee, S. M. Kim, D. Park, C. Jin, S. P. Honh, Y. S. Lee, "A new epicatechin gallate and calpain inhibitory activity from *orostachys japonicas*.", *Fitoterapia*, **80**, 73-76 (2009).

