

植物由来のクロロゲン酸代謝産物を用いた化粧品素材としての配糖体の合成とその美白効果に関する研究

近畿大学 工学部化学環境工学科、近畿大学 農学部農芸化学科*

野村 正人、澤 辺 昭 義[#]、藤 原 義 人

Research in the areas of medical and cosmetic treatments has progressed rapidly though the use of plants and herbs. As soon as an evident biological activation substance is extracted independently from a natural ingredient, research of all its chemical synthesis of similar compounds, exchange of microorganisms, and biological metabolism is also studied, for research and development in hope of a stronger biological activation. On the other hand, because of environmental destruction on a global scale is a problem with the effect on the human body. The ubiquitous use of flon gas and the resulting destruction of the ozone layer was led do increasing ultraviolet radiation reaching the surface of the earth and the consequential thus led to an increase to melanin which causes the formation of stains and freckles.

The investigation of natural products have bee increased expecting the effectiveness and safety. Caffeic acid (3,4-dihydroxy cinnamic acid)(2), ferulic acid (trans-4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid)(3) and isoferulic acid (trans-3-hydroxy-4-methoxy cinnamic acid)(4) may be readily obtained by hydrolysis of chlorogenic acid (1). (1) was isolated from green coffee beans. In this report, we synthesized three compounds (2) - (4) form 3, 4-dihydroxy benzoic acid (5), 4-hydroxy-3- methoxy benzoic acid (6) and 3-hydroxy-4-methoxy benzoic acid (7) by reduction (LiAlH₄), Jones oxidation and condensation with malonic acid.

We conducted tests targeted at the tyrosinase activity, superoxide scavenging activity and hyaluronidase activity inhibitor for compounds and made evaluation in the direction of practical use. Of the compounds (3) and (4) showed strong tyrosinase inhibitory activity and superoxide scavenging activity. Some of these compounds are only effective in the tyrosinase stage, while the compounds (3) and (4) in this report are show a high inhibition effect in both the tyrosine and DOPA stage. We found favorable results daggering from cosmetic whiteners that originate from natural ingredients that have been reported in the past.

1. 緒 言

古来から、人間が病気にかかったときに、それを治そうとして昔から頼ってきたものに、日常ごく身近な植物があった。植物を用いる治療方法が人類の歴史の古い時期から自然に行われてきたことは、今日病気にかかった野生動物が特定の植物を食する行動によってもおしはかることができる。世界各地に文明が栄え始めた頃から、薬用植物に関する知識も芽生え、その後、数多くの薬物書が生まれ、今日の生薬学に至っている。現在、天然有機物質が医薬品ならびに化粧品開発の分野における宝庫であることは、今も昔も変わらず、これらに関する研究が盛んに行われている。ひとたび天然有機物質から顕著な生物活性物質が単離されれば、その化学的全合成、化学構造の修飾、類似化合物の合成、微生物変換、生化学的代謝の研究が行われるなど、より強い生物活性を期待した研究開発が実施されている^{1, 2)}。

近年地球規模での環境破壊問題の一つとして、冷蔵庫、エアコンなどの冷媒として使用されているフロンガスの大

気中への放出により、オゾン層の破壊が起こり、地表に届く紫外線が増加し、シミおよびソバカスの生成をもたらす原因であるメラニンの生成が増加するなど紫外線の人体へ及ぼす影響が問題となっている³⁾。こうした現状から、美白化粧品に対する消費者の要求はその機能と効果に注がれている。そこで、自然界に広く分布している植物性食品中に含有されるクロロゲン酸(1)の生物活性に注目した。すなわち、活性酸素抑制効果および人体での変異性病原性物質の生成を阻害するなどの薬理効果がある(1)を含有する植物の摂取により、生体内で分解され最終代謝物としてカフェエ酸(2)、フェルラ酸(3)、イソフェルラ酸(4)およびバニリン酸(4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸)(6)などになることが知られている⁴⁾。

本研究では(2)、(3)および(4)を基質にとり、アセトプロモ- α -D-グルコースなどの多糖類との縮合反応により、水溶性配糖体を効率的かつ経済的に合成する手法を確立した。得られた配糖体については、酵素レベルでの美白効果試験とB-16細胞に対する毒性試験を実施し、機能性化粧品材料化学への展開について検討する。また、植物性食品中に広く含有し活性酸素抑制効果ならびに人体での変異性病原性物質の生成を阻害するなどの薬理効果がある(1)からの代謝物であり、生体内で分離される最終代謝物の(2)、(3)および(4)を、それぞれ4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸(バニリン酸)(6)、3-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド(7)および3,4-ジヒドロキシ安息香酸(5)から効率よく合成する手法の確立と同時に、これらを含む数種の関連化



Studies on the Synthesis of the Glycoside and Whitening Effects as a Cosmetics Material Using the Chlorogenic acid its Metabolite Contained in the Plants.

Masato Nomura, Akiyoshi Sawabe[#], and Yoshihito Fujihara^{*}

Department of Chemistry and Environmental Technology, Faculty of Engineering, Kinki University, Department of Agricultural Chemistry Faculty of Agriculture, Kinki University[†]

化合物(6), (8)および(9)についての美白効果ならびに任意の割合で混合した試料(A)~(J)についても美白効果を検討し, 個々の化合物間での相乗効果による美白効果向上についても明らかにした。

2. 実験

2.1 試薬

出発原料である4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸(6), 3-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド(7)および3,4-ジヒドロキシ安息香酸(5)は, 市販品(和光純薬製および東京化成工業製)を使用した。

2.2 機器分析

各縮合生成物の構造については, 既報⁵⁾に記載した方法により確認した。

2.3 合成方法

2.3.1 フェルラ酸(4-ヒドロキシ-3-メトキシケイ皮酸)(3)およびイソフェルラ酸(3-ヒドロキシ-4-メトキシケイ皮酸)(4)の合成

水素化アルミニウムリチウム(LiAlH_4) 0.4g (1.05×10^{-2} mol) をテトラヒドロフラン(THF) 30mLに懸濁し, 4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸(6) 1.0g (5.95×10^{-3} mol) を溶解したTHF溶液 15mLを1時間を要して滴下した。その後, 室温で4時間攪拌した。反応終了後, 油分をエーテル抽出し水洗したのち, 無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し4-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアルコールを収率86.5%で得た。ついで, このアルコール 1.0g (6.49×10^{-3} mol) をジクロロメタン 30mLに溶解したのち, PDC試薬($\text{CrO}_3 : \text{H}_2\text{O} : \text{Pyridine} : \text{Acetone} = 4\text{g} : 4\text{mL} : 3.2\text{g} : 16\text{g}$) 2.3gを溶解したジクロロメタン混合溶液 15mLを冷却下に1時間を要して滴下した。その後, 室温で48時間攪拌した。反応終了後, 油分をエーテル抽出し水洗した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥, 溶媒を留去し, 4-ヒドロキシ-3-メトキシベンズアルデヒドを収率72.2%で得た。次にマロン酸 1.25g (1.20×10^{-2} mol) を溶解したピリジン溶液 10mLに, このアルデヒド 1.5g (9.87×10^{-3} mol) を加え, 油浴上(70~75°C)で2日間加熱攪拌した。反応終了後, 油分を常方通り後処理を行い4-ヒドロキシ-3-メトキシケイ皮酸(3)を収率62.4%で得た。また, 3-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド(7)についても同様な操作を行い3-ヒドロキシ-4-メトキシケイ皮酸(4)を収率60.8%で得た。

2.3.2 カフェ酸(3,4-ジヒドロキシケイ皮酸)(2)の合成

3,4-ジヒドロキシケイ皮酸(5) 1.0g (6.49×10^{-3} mol) を用いて, 2.3.1の項に示したLAH還元, PDC酸化およびマロン酸縮合の操作方法に従って順次行い, 3,4-ジヒ

ドロキシケイ皮酸(2)を収率58.2%で得た。

2.3.3 グリコシド体(配糖体)の合成

脱水ジクロロメタン 5mLにアセトブロモ- α -Dグルコース 0.617g (1.5×10^{-3} mol), トリフルオロメタン酸スズ(II) 0.625g (1.5×10^{-3} mol)を入れ, 室温下で攪拌した後, この混合溶液に常法どおりの操作により誘導したフェルラ酸メチル 0.208g (1.0×10^{-3} mol)の脱水ジクロロメタン溶液 5mLと, 1,1,3,3-テトラメチル尿素 0.2g (1.7×10^{-3} mol)を加え, 18時間攪拌した。反応終了後, 炭酸水素ナトリウム水溶液 100mLを加え, ジクロロメタンで抽出(100mL \times 2)した。ジクロロメタン層を飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥, 溶媒を留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒 n-ヘキサン:酢酸エチル=1:1)により精製し, フェルラ酸メチルテトラアセチルグリコシドを収率79.5%で得た。ついで, フェルラ酸メチルテトラアセチルグリコシド 0.271g (5×10^{-4} mol)をナトリウムメトキシドを用いて, 脱アセチル化した後, イオン交換樹脂(DOWEX-50W)を用いて中和した。イオン交換樹脂をろ別した後, 減圧下に溶媒を留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒 クロロホルム:メタノール=5:1)により精製し, フェルラ酸メチルグリコシド(3-Glc)を0.122g(収率65.9%)得た。同様の操作をイソフェルラ酸(4)について行い, イソフェルラ酸メチルグリコシド(4-Glc) 0.097g(収率52.6%)を得た。

2.4 生物活性試験

2.4.1 チロシンを基質としたチロシナーゼ阻害活性試験

それぞれの化合物を所定の濃度(0.1mM)に調製したのち, チロシナーゼ(Sigma chemical社製, EC1.14.18.1)を用いて, 前報⁶⁾に従って操作し475nmに設定した分光光度計で測定した。

2.4.2 DOPAを基質としたチロシナーゼ阻害活性試験

3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン(DOPA)(和光純薬社製)を所定の濃度(1.66mM)に調製したのち, 2.4.1項に示した前報⁶⁾に準じて行った。

2.4.3 活性酸素消去効果試験

それぞれの化合物を所定の濃度(0.714mM)に調製した後, Superoxide dismutase(SOD), ワコーテスト試薬(和光純薬社製)を用いて前報⁶⁾に従って操作し, 生成するジホルマザンを560nmに設定した分光光度計で測定した。

2.4.4 ヒアルロニダーゼ阻害活性試験

0.4%のヒアルロン酸を含むリン酸緩衝液(pH6.0)を調製したのち, ヒアルロニダーゼ(Sigma chemical社製,

EC3.2.1.35) を用いて前報⁶⁾に従って Ostwald 粘度計 (No.4) で測定した。

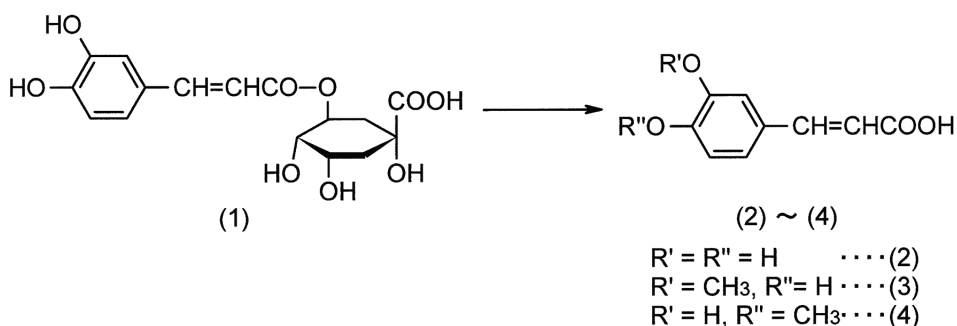
3. 結果および考察

クロロゲン酸(1)は植物性の食品原料中に存在するが、とくに嗜好品の一つであるコーヒー中には比較的少量に存在し、その供給源として重要であり、コーヒー製品が人体に与える生理学的影響についての研究^{7,8)}も盛んに行われている^{7,8)}。たとえば、(1)は胃腸管内に吸収されると血清中や胆汁中には検出されず、キニン酸とカフェ酸(2)に分解され、さらに代謝される。(2)は腸内細菌により m-ヒドロキシプロピオン酸に変換されたのち、脱炭素され、ごく一部は肝臓中でメチル化(3)、(4)および(6)になる (Scheme 1)。そこで、これら化合物を簡便で収率よく得る合成方法の確立とともに高付加価値的利用の一つとして化粧品美白剤への検討を行った。まず、これら化合物の合成方法として、Scheme 2 に示した酸化・還元・マロン酸縮合の組み

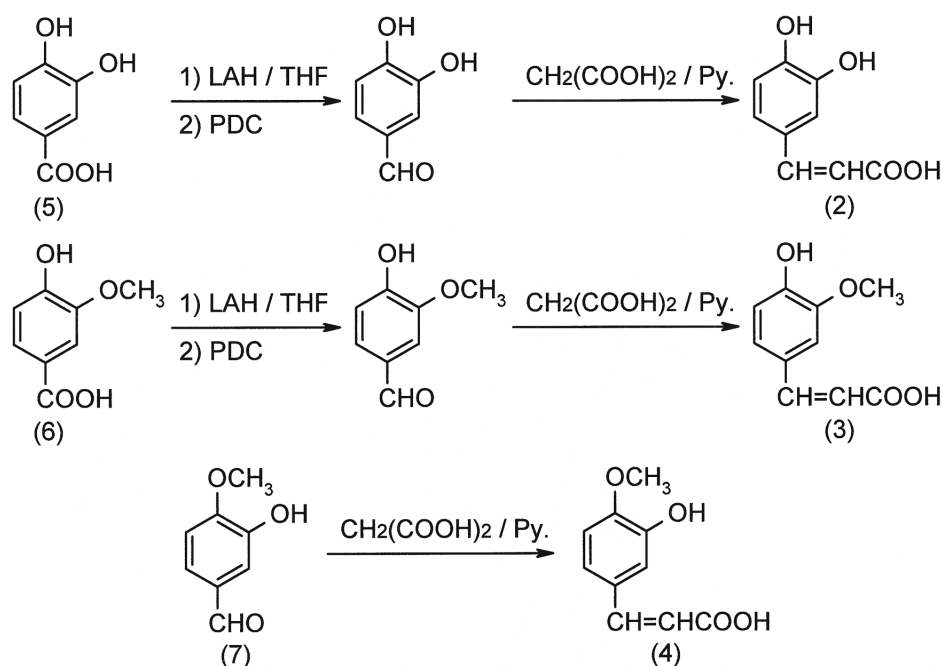
合わせのみで合成可能な出発原料として市販品 (和光純薬製および東京化成工業製) である(5)、(6)および(7)を用いて行った結果、(6)から(3)を 39% の収率で、(7)から(4)を 60.8% の収率で得ることができた。また、(5)から(2)を 25.5% の収率で得ることができた。

つぎに、これら合成した化合物(2)、(3)および(4)と(1)からの分解生成物として可能性のある化合物(8)および(9)について、化粧品配合剤の美白効果を期待し、チロシナーゼ阻害活性、活性酸素消去効果ならびにヒアルロニダーゼ阻害活性試験を検討した結果を表 1 に示す。また、比較物質として用いた(10)~(12)についても表 1 に示す。

シミおよびソバカスの生成原因であるメラニンの生合成経路における酵素チロシナーゼはチロシンをヒドロキシル化して DOPA に変化し、さらに DOPA を酸化してドーパキノンに変化する段階で触媒として作用するため、チロシナーゼを阻害することでこれらを抑制することが可能とされている。このことをふまえて、チロシナーゼ阻害活性を



Scheme 1



Scheme 2

検討したところ、とくに、(1)および(1)の分解生成物である(3)および(4)はチロシン基質とDOPA基質において、いずれも良好な阻害を示す数値が得られ、美白効果が期待される。つぎに、DNAの攻撃、皮膚老化の促進あるいはメラニン生成に影響を及ぼすなどの有害作用がある活性酸(O₂⁻, ¹O₂, H₂O₂, LOOH, ·OH)に対する消去効果について検討したところ、(1), (2)および(4)に良好な消去効果を示す数値(いずれも70%以上)が認められ、これらの症状に対する働きのある化粧品配合剤としての利用も可能であるものと思われる。

一方、動物の様々な組織、間接液あるいは皮膚などに存在するヒアルロン酸の分解酵素として考えられているヒアルロニダーゼの働きとしては、細胞間隙の水分保持、細菌感染の防止あるいは皮膚の潤滑化と柔軟性の保持な

どがある。このようなことから、その活性を抑制することで、小じわやカサツキなどの老化を防ぐことができ、機能的化粧品の特徴の一つとして重要であることから、今回の化合物についても検討したところ、いずれも著しい阻害活性を示す数値は得られなかった。

以上、3つの阻害活性試験の結果から、それぞれの化合物を単独で使用するよりも混合物として使用する方が、生薬あるいは漢方に見られるような相乗効果が生じて、より良い阻害効果が期待できるものと考え、表1に示した結果から(1)~(4), (6), (8)および(9)の化合物を表2に示したそれぞれの任意の割合で調合し、美白効果(チロシナーゼ阻害活性試験および活性酸素消去効果)を検討した。その結果を表3に示す。チロシナーゼ阻害活性試験では化合

表1 化合物(1)~(12)の美白効果試験結果

化合物 ^{a)}	チロシナーゼ阻害活性		活性酸素消去効果	ヒアルロニダーゼ阻害活性
	チロシン基質	DOPA基質		
クロロゲン酸(1)	47.55 ^{b)}	29.60	74.39	1.98
カフェ酸(2)	5.71	-14.02	75.24	-0.31
フェルラ酸(3)	36.03	24.62	45.85	1.81
イソフェルラ酸(4)	48.99	37.12	71.12	1.11
3,4-ジヒドロキシ安息香酸(5)	4.92	-6.20	38.21	-1.27
4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸(6)	7.60	-1.89	30.14	-1.06
3-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド(7)	32.15	3.50	23.04	-1.98
4-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアルコール(8)	3.34	-16.29	56.32	-0.58
4-ヒドロキシ-3-メトキシケイ皮アルデヒド(9)	32.61	-8.71	36.46	-1.25
オイゲノール(10)	34.31	15.75	43.48	3.92
イソオイゲノール(11)	29.50	-0.16	57.92	7.62
1,2-ジメトキシ-4-プロペニルベンゼン(12)	3.45	4.23	0.47	-0.13

a) Concentration: 0.1mM b) Inhibitory rate (%)

表2 化合物(1)~(9)試料の混合割合

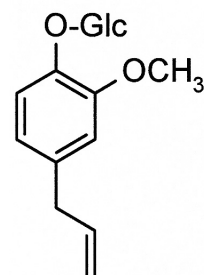
化合物 試料番号	(1)	(2)	(3)	(4)	(6)	(8)	(9)
(A)	50	10	10	10	10	10	10
(B)	40	10	20	10	10	10	10
(C)	40	10	10	20	10	10	10
(D)	30	10	20	20	10	10	10
(E)	20	10	30	30	10	10	30
(F)	10	5	30	30	5	5	30
(G)	10	10	40	10	10	10	10
(H)	10	10	10	40	10	10	10
(I)	10	10	10	10	10	10	40
(J)	10	30	5	5	30	30	5

(単位: mg)

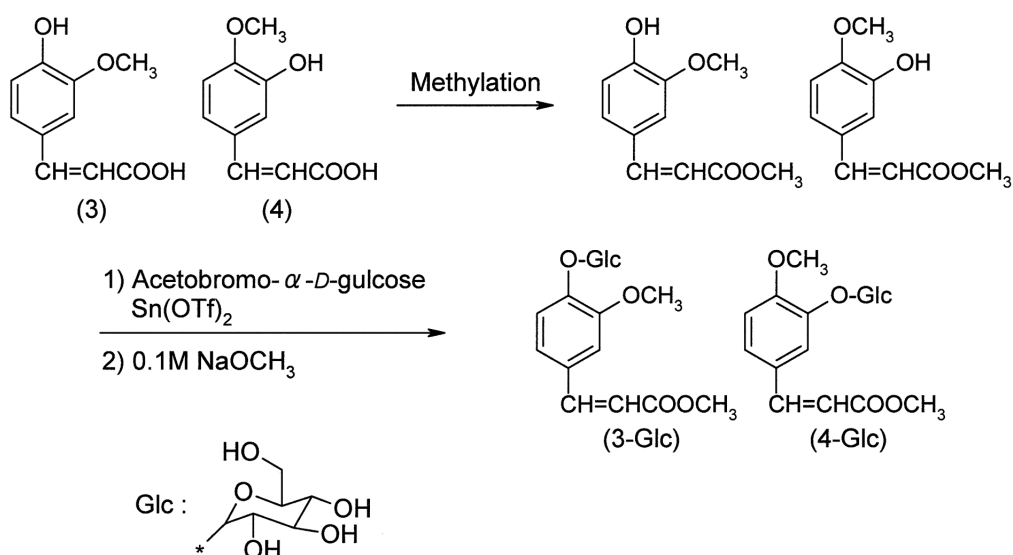
表3 混合試料(A)~(J)美白効果試験結果

試料番号	チロシナーゼ阻害活性*		活性酸素消去効果	
	チロシン基質	DOPA基質	濃度 1.0%	濃度 0.1%
(A)	30.1	33.5	78.8	50.6
(B)	29.5	42.0	88.8	60.8
(C)	42.7	42.5	88.8	53.3
(D)	23.1	42.5	92.6	56.0
(E)	6.8	37.5	97.7	69.6
(F)	14.8	42.5	94.6	64.7
(G)	3.9	33.5	91.6	65.9
(H)	15.7	40.5	90.1	53.5
(I)	3.8	24.9	95.2	65.1
(J)	22.9	16.8	90.1	24.8

*Concentration 1.0%



Scheme 3



Scheme 4

物(3)および(4)の調合割合が阻害活性に大きな影響を及ぼすことが認められ、いずれも DOPA 基質において、その阻害活性が向上 (40% 以上の数値) した。その中でもとくに、試料番号 (B) および (C) ではチロシンを基質とした場合においても、良好な阻害活性が認められた。また、活性酸素消去効果試験においても著しい抑制効果を示す数値 (90% 前後) が得られたことから、さらに測定濃度を希釈 (0.1%) した場合にも、良好な消去効果を示す数値が得られた。

つぎに、著者らはチロシナーゼ阻害活性および活性酸素消去効果試験でそれぞれ高い阻害効果が認められた化合物(3)および(4)について、実用的使用を考慮し水に可溶性化合物に誘導することにより、皮膚浸透性を高め、同時に美白効果も保持されるものと思い、グルコースを導

入した化合物 (3-Glc) および (4-Glc) の合成を行ったところ、収率よく合成 (Scheme 4) することができた。これら 2 種類のグリコシド体の美白効果試験を実施した結果を表 4 に示す。それぞれの阻害活性は測定する試料濃度にも依存することが明らかであり、しかもこれら化合物はいずれも高い水溶性を持たせることができたことから、今回の測定実験においても同様に、最終濃度を 0.1mM で行った。その結果、とくに前駆体である化合物(3)および(4)のチロシナーゼ阻害活性が比較的高い値を示したのに対して、誘導したグリコシド体 (3-Glc) および (4-Glc) では、いずれも阻害活性値が小さくアルブチンと同等の値を示すことがわかった。また、著者らもこれらマッシュルーム由来のチロシナーゼに対する阻害活性機序は、拮抗阻害があ

表4 配糖体(3-Glc) および (4-Glc) の美白効果試験結果

化合物 ^{a)}	チロシナーゼ阻害活性		活性酸素 消去効果	ヒアルロニダーゼ 阻害活性
	チロシン基質	DOPA 基質		
(3-Glc)	7.45 ^{b)}	10.36	1.54	-2.03
(4-Glc)	10.92	12.30	0.24	13.10
Citrusin C	47.20	87.93	4.35	7.32
Arbutin	7.5	14.9	0.5	-30.20

a) Concentration: 0.1mM b) Inhibitory rate (%)

ることを明らかにしており、今回の測定濃度は細胞増殖に影響のない濃度であると思われることから、フェニルプロパノイドがメラノサイトに作用することなくメラノサイトに対するチロシナーゼ阻害または、整合性阻害が生起しているものと考えている。

このようなことから母格のフェニルプロパノイドのベンゼン環にヒドロキシル基とメトキシ基が存在し、側鎖に α , β -不飽和カルボン酸が存在しているそれぞれの化合物を任意の割合で混合することにより、相乗効果が著しく発現し、美白剤として重要であるチロシナーゼ阻害活性および活性酸素消去効果を期待どおり向上させることができた。また、著者らは比較物質として用いたオイゲノールのグルコース配糖体としてアフリカ産食用葉のノゲイトウ (*Celosia Argentea* L.) に含まれるシトラシンC (Scheme 3) の合成に成功するとともに、非常に高い美白効果があることについても明らかにすることができたことから、クロロゲン酸分解生成物である(3)および(4)の配糖体合成を行い美白効果を検討したが、シトラシンCよりも高い阻害活性

値は得られなかった。しかし、市販品であるアルブチンと同等の値を示すことを明らかにすることができた。

(参考文献)

- 1) C. H. Muller, W. H. Muller, B. L. Haines, *Science*, **143**, 471 (1964).
- 2) H. Okudaira, *Medicam News*, **1323**, 20 (1991).
- 3) W. H. Eaglstein, *Cosmetic and Perfumery*, **90**, 25 (1975).
- 4) A. N. Booth, O. H. Emerson, F. T. Jones, *J. Biol. Chem.*, **229**, 51 (1957).
- 5) 野村正人, 立花伸哉, 山田康裕, 藤原義人, *農化*, **73**, 605 (1999).
- 6) 野村正人, 西村和彦, 藤原義人, 多田貴広, 服部文弘, 下村健次, *油化学*, **49**, 143 (2000).
- 7) M. P. Lachance, *J. Food Safety*, **4**, 71 (1982).
- 8) P. W. Curatolo, D. Robertson, *Ann. Int. Med.*, **98**, 641 (1982).