

多様な皮膚酸化傷害を制御するガロイル化フラボノイド素材の探索

徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部

増田 俊哉

Potent inhibitory activity of the leaves of *Myrica rubra* against both chemical and enzymatic (tyrosinase and lipoxygenase) oxidations was found in this project. Constituent analysis of the most active ethyl acetate-soluble part of the methanol extract of the leaves clarified the structures of eight major compounds. The tyrosinase and lipoxygenase inhibitory activities and DPPH radical scavenging activity of the isolated compounds were measured as indication of inhibition capacity for the enzymatic and chemical oxidation related to skin injury. The obtained data revealed that enhanced chemical and enzymatic antioxidant activities of the constituents mainly depended on the galloyl group on the compounds.

1. 緒 言

生体の酸化的傷害は酸素のある限り避けることはできないが、その酸化を遅延させるような制御は可能である。ところで、皮膚は、人において酸化傷害が顕著に現れるところの一つと考えられる。なぜなら皮膚は直接大気中の酸素と接し、酸化のトリガーとなる太陽光を浴び、また、環境中の重金属のような酸化開始剤にさらされる機会も多いからである。またそのような化学的原因による酸化以外にもアラキドン酸の酵素酸化のような各種生体酸化酵素反応も皮膚にとっては重篤な傷害ともなり得る。なお、皮膚の酸化の制御は、酸化傷害が重篤になってから処方される医薬品以外に、日常において使用される化粧品に予防的な効果を期待することが可能と考えられる。しかしその一方で、皮膚の酸化傷害の原因は多様であり、これを完全かつ予防的に制御するには、それぞれに適応する制御剤が多数必要になり、現状では實際上完全制御は困難である。ところで、一連の類似物質が様々な酸化に対する多様な制御能を併せ持てば、完全制御の可能性を有する製品素材の開発に近づけることになると考えられる。そのような目的達成のため、本研究ではガロイル化されたフラボノイドに着目する。フラボノイドは化学的な酸化制御能が強く、また、ある種のフラボノイドにはリポキシゲナーゼのような酸化酵素に対する制御能も認められている。さらにガロイル基にも同様な制御作用が期待でき、したがって、それらが複合した物質には、必然的に多様な制御能が期待できるからである。そこで、本研究では、そのようなガロイル化された多数のフラボノイドをまず身近な天然素材に探索し、更にその制

御特性を化学構造を基盤に解明することにより、多様な皮膚酸化傷害に完全に適応できるガロイル化フラボノイドを見出し、新しい化粧品素材として構築することを目的として研究を行った。

本研究では、天然素材として、これまでの我々の研究室で取り扱った植物の中から、ガロイルフラボノイド含有が期待されるヤマモモ葉を対象に実験を行った¹⁻³⁾。ヤマモモは、中国原産のバラ科高木であり、その実はフルーツとして食される。一方、樹皮は楊梅皮という生薬として知られ、タンニンに富み、止瀉作用や消炎作用があるとされている⁴⁾。このヤマモモは、四国においては、徳島県の県木、高知県の県花として身近でなじみ深い植物であり、葉部は健康茶としての民間利用実績も見られる。

2. 実 験

2・1 研究材料

ヤマモモ (*Myrica rubra*) は、徳島県小松島市櫛淵町のみその農園 (仁木博之氏) より枝を入手し、その葉部 (1.7 kg) を室温にて、20Lのメタノールに10日間浸漬した。それをろ過し、減圧下で、メタノールを留去したもの (309 g) をヤマモモ抽出物とした。

2・2 DPPHラジカル消去能の測定¹⁾

サンプル液100 μ Lを試験管に取り、4.8 mLのメタノールを加えた。更に、5 mMのDPPH液を加え、よく攪拌し、この時を0時として30分後に517nmの吸光度を測定した。サンプルをメタノールに置き換えたものをコントロール、DPPHをメタノールと置き換えたものをブランクとして、測定は3連で行い、下式を用いて活性強度を算出した。

$$\text{活性強度} = (\text{コントロール Abs}) - (\text{サンプル Abs}) + (\text{ブランク Abs})$$

2・3 チロシナーゼ阻害活性の測定³⁾

8 $\times$ 12の96穴マイクロプレートを用いて以下のように条件を設定した。A (3セル)、B (1セル)、C (3セル)、



Chemical Survey for the Galloyl
Flavonoids Exerting Protective Effects
against Various Oxidative Skin Injuries

Toshiya Masuda

Institute of Socio Arts and Sciences,
University of Tokushima

D (1セル) の計 8 セルを用いて、A : 1/15 M リン酸緩衝液 (pH=6.8) 120 μ L、チロシナーゼ溶液 (355 units/mL) 40 μ L、B : 1/15 M リン酸緩衝液 (pH=6.8) 160 μ L、C : 1/15 M リン酸緩衝液 (pH=6.8) 80 μ L、チロシナーゼ溶液 (355 units/mL) 40 μ L、2.5 mg/mL 試料溶液 40 μ L、D : 1/15 M リン酸緩衝液 (pH=6.8) 120 μ L、2.5 mg/mL 試料溶液 40 μ L をそれぞれ加えて攪拌後、23℃で10分間静置した。1/15 M リン酸緩衝液 (pH=6.8) に溶解した 2.5 mM L-DOPA 溶液をそれぞれのセルに 40 μ L 加え、23℃で10分間、波長 475 nm における吸光度を測定した。ポジティブコントロールとしてコウジ酸を用いた。阻害率は以下の式を用いて算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{[(A-B) - (C-D)] / (A-B)\} \times 100$$

2・4 リポキシゲナーゼ阻害活性の測定⁵⁾

石英セルに 0.1 M (pH = 8.0) トリス塩酸緩衝液を 2.9 mL、1 mM リノール酸液 (in MeOH) を 50 μ L、サンプル液を 20 μ L 加え、ラップで封をし攪拌した。検出器にセットし、25℃で10分間静置させ、その後、リポキシゲナーゼ液 (13200 units/mL) を 5 μ L 加え、再びラップで封をし攪拌後、すみやかに検出器にセットし 234 nm の吸光度を経時分析した。サンプルをメタノールに置き換えたものをコントロールとした。測定は3連で行い、下式をもちいて阻害率を算出した。なお、ポジティブコントロールとして NDGA メタノール溶液を用いた。阻害率の算出には 5 分後の吸光度変化率を用いた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (\text{コントロール } \Delta\text{Abs} - \text{サンプル } \Delta\text{Abs}) / (\text{コントロール } \Delta\text{Abs}) \times 100$$

2・5 ヤマモモ抽出物の分画

ヤマモモ抽出物 300 g をメタノール 2 L と蒸留水 220 mL に溶かした。これをヘキサン 2 L で分配し、メタノール分画層とヘキサン分画層を得た。ヘキサン分画層は濃縮・乾固し 26.7 g のヘキサン可溶部を得た。続いて、メタノール分画層を減圧下で濃縮し、メタノールを除去し、更に蒸留水を 2 L 加え、酢酸エチル 2 L、及び 1 L で計 2 回分配を行い、酢酸エチル層を減圧下で濃縮・乾固し 64.2 g の酢酸エチル可溶部を得た。次に、水飽和させたブタノール 2 L で水分画層を分配し、それぞれ減圧下で濃縮・乾固し、ブタノール可溶部を 91.6 g、そして水可溶部を得た。

2・6 ヤマモモカロイルフラボノイド類の単離

シリカゲル (Silica gel 60) 500 g に、ヤマモモ抽出物酢酸エチル可溶部 64 g を 1% 酢酸/クロロホルムと少量のメタノールで溶かし吸着させた。1% 酢酸 5% メタノール/

クロロホルムを 2 L 流し、更にメタノール濃度を 10%、20%、30%、40%、50%、70%、100% と上げて、それぞれ 2 L ずつカラムに流し分画した。それぞれの分画を減圧下で濃縮乾固し 5% 溶出部は 11.2 g、10% 溶出部は 11.1 g、20% 溶出部は 20.0 g、30% 溶出部は 30.0 g、40% 溶出部は 13.8 g、50% 溶出部は 13.7 g、70% 溶出部は 2.32 g、100% 溶出部は 1.36 g を得た。そのうち 50% 溶出部 (13 g) を ODS (Cosmosil 140 C18-OPN) カラムクロマトグラフィーに供し、10% から 100% のメタノール-水で溶出した。そのうち、40% メタノール溶出サンプル (0.6 g) を分取 HPLC [TSK-GEL ODS-80TS (20×250 mm) column (Solvent: 1% AcOH in CH₃OH-1% AcOH in H₂O=9:11)] にて精製し、化合物 **1** (179 mg) と **5** (42 mg) を単離した。30% メタノール溶出サンプル (30 g) を再度 ODS のカラムクロマトに供し 1% 酢酸含有メタノール (5% から 100%) で溶出した。その 40% メタノール溶出サンプル (600 mg) を Sephadex LH-20 カラム (1% AcOH in CH₃OH) に供し、続いて分取 HPLC [TSK-GEL ODS-80TS (20×250 mm) column (Solvent: 1% AcOH in CH₃OH-1% AcOH in H₂O=9:11)] により **2** (161 mg) と **3** (49 mg) を得た。5% メタノール溶出サンプル (55 mg) についても分取 HPLC (Solvent: CH₃CN-1% AcOH in H₂O=1:3) で精製し **6** (27 mg) と **7** (17 mg) を単離した。次に最初の ODS カラムの 40% メタノール溶出部 (14 g) を再度 ODS のカラムクロマトに供し 1% 酢酸含有メタノール (5% から 100%) で溶出し、その 30% メタノール溶出サンプル (520 mg) を分取 HPLC (Solvent: CH₃CN-1% AcOH in H₂O=9:11) にて精製し **1** (151 mg), **4** (7 mg) と **5** (17 mg) を単離した。また、最初のカラムの 5% メタノール溶出部 (1 g) についても、再度 ODS カラム (30% methanol containing 1% AcOH in H₂O) と分取 HPLC (Solvent: CH₃CN-1% AcOH in H₂O=3:17) にて精製し **8** (7 mg) を得た。

3. 結果および考察

3・1 ヤマモモ抽出物酢酸エチル可溶画分の成分分析と成分の構造解析

ガロイルフラボノイドの存在が期待されるヤマモモ葉部メタノール抽出物には、我々の研究室におけるスクリーニング実験において、顕著なラジカル消去活性 (IC₅₀ 6 μ g/mL), チロシナーゼ阻害活性 (IC₅₀ 0.23 mg/mL), リポキシゲナーゼ阻害活性 (IC₅₀ 26 μ g/mL) が認められていた。ラジカル消去活性は、幅広い酸素性ラジカル種 (いわゆる活性酸素) の消去能に連動し、常に外気に触れる皮膚における様々な障害を取り除く可能性のあるものである。一方リポキシゲナーゼは炎症に関わる酵素であり、チロシナーゼは皮膚のシミ、ソバカスなどの原因となる酸化酵素である。ヤマモモ抽出物が有するこれらの阻害等の活性は、我々

がこれまでスクリーニングしてきた沖縄産の薬草類の機能に匹敵するものであった^{1, 2)}。そこで、活性を指標にして成分を明らかにすべく溶媒分画を行ったところ、その活性は主に酢酸エチル可溶画分に移行した。酢酸可溶画分が含有する成分をグラジエントHPLC法を用いて総分析した結果を図1に示した。この中に活性を有するガロイルフラボノイドが存在すると仮定し、それぞれのピーク物質の単離を試みた。結果、実験方法に示したように、8種の物質の単離に成功した。その物質の機器分析データは以下のとおりである。

1. $[\alpha]_D^{25} -127^\circ$ (*c* 1.0, CH₃OH); ESI-MS *m/z* (M+Na)⁺: Calcd for C₂₁H₂₀O₁₂Na: 487.0852, Found: 487.0877. NMR δ_H (acetone-d₆): 6.24 (1H, d, J=2.0 Hz, H6), 6.45 (1H, d, J=2.0 Hz, H8), 7.08 (2H, s, H2' and H6'), 5.44 (1H, brs, H1''), 4.22 (1H, brs, H-2''), 3.77 (1H, dd, J=9.0 and 2.6 Hz, H3''), 3.36 (1H, t, J=9.0 Hz, H4''), 3.52 (1H, m, H5''), 0.92 (3H, d, J=6.1 Hz, H6''). NMR δ_C (CD₃OD): 159.2 (C2), 136.2 (C3), 179.4 (C4), 162.9 (C5), 99.7 (C6), 165.6 (C7), 94.6 (C8), 158.3 (C9), 105.7 (C10), 121.9 (C1' and C6'), 146.6 (C3' and C5'), 137.7 (C4'), 103.4 (C1''), 71.9 (C2''), 72.0 (C3''), 73.2 (C4''), 71.8 (C5''), 17.6 (C6''). **2.** $[\alpha]_D^{25} -4^\circ$ (*c* 0.5, CH₃OH); ESI-MS *m/z* (M+Na)⁺: Calcd for C₂₈H₂₄O₁₆Na: 639.0962, Found: 639.0984. NMR δ_H (CD₃OD): 6.19 (1H, d, J=2.0 Hz, H6), 6.35 (1H, d, J=2.0 Hz, H8), 6.97 (2H, s, H2' and H6'), 5.50 (1H, d, J=1.5 Hz, H1''), 5.62 (1H, dd, J=3.3 and 1.5 Hz, H2''), 4.03 (1H, dd, J=8.5 and 3.3 Hz, H3''), 3.43-3.45 (2H, complex, H4'' and H5''), 1.03 (3H, d, J=5.5 Hz, H6''), 7.07 (2H, s, H2''' and H6'''). NMR δ_C (CD₃OD): 159.4 (C2), 135.6 (C3), 179.3 (C4), 163.1 (C5), 99.8 (C6), 165.7 (C7),

94.7 (C8), 158.4 (C9), 105.8 (C10), 121.8 (C1'), 109.6 (C2' and C6' or C2'' and C6'''), 146.8 (C3' and C5' or C3''' and 5'''), 137.9 (C4'), 100.4 (C1''), 73.5 (C2''), 70.7 (C3''), 73.8 (C4''), 72.2 (C5''), 17.8 (C6''), 121.2 (C1'''), 110.4 (C2''' and C6''' or C2' and C6'), 146.4 (C3''' and 5''' or C3' and C5'), 139.9 (C4'''), 167.5 (C7'''). **3.** $[\alpha]_D^{25} -118^\circ$ (*c* 0.1, CH₃OH); ESI-MS *m/z* (M+Na)⁺: Calcd for C₂₈H₂₄O₁₆Na: 639.0962, Found 639.0974. NMR δ_H (CD₃OD): 6.20 (1H, d, J=2.0 Hz, H6), 6.37 (1H, d, J=2.0 Hz, H8), 7.00 (2H, s, H2' and H6'), 5.28 (1H, d, J=1.9 Hz, H1''), 4.48 (1H, dd, J=3.4 and 1.9 Hz, H2''), 5.25 (1H, dd, J=9.3 and 3.4 Hz, H3''), 3.67 (1H, t, J=9.3 Hz, H4''), 3.72 (1H, m, H5''), 1.00 (3H, d, J=5.8 Hz, H6''), 7.17 (2H, s, H2''' and H6'''). **4.** $[\alpha]_D^{25} +13^\circ$ (*c* 0.1, CH₃OH); NMR δ_H (acetone-d₆): 6.26 (1H, d, J=2.0 Hz, H6), 6.51 (1H, d, J=2.0 Hz, H8), 7.50 (2H, s, H2' and H6'), 5.19 (1H, d, J=7.8 Hz, H1''), 3.83 (1H, dd, J=9.5 and 7.8 Hz, H2''), 3.68-3.58 (3H, complex, H3'', H5'', and H6''), 3.93 (1H, brd, J=3.1 Hz, H4''). NMR δ_C (CD₃OD): 158.5 (C2 or C9), 136.0 (C3), 179.4 (C4), 162.9 (C5), 99.8 (C6), 166.0 (C7), 94.7 (C8), 158.3 (C9 or C2), 103.6 (C10), 121.7 (C1'), 110.0 (C2' and C6'), 146.4 (C3' and C5'), 138.1 (C4'), 105.6 (C1''), 73.3 (C2''), 75.1 (C3''), 70.0 (C4''), 77.2 (C5''), 61.9 (C6''). **5.** $[\alpha]_D^{25} -83^\circ$ (*c* 0.1, CH₃OH); ESI-MS *m/z* (M+Na)⁺: Calcd for C₂₈H₂₄O₁₇Na: 655.0911, Found 655.0869. NMR δ_H (acetone-d₆): 6.20 (1H, d, J=2.0 Hz, H6), 6.43 (1H, d, J=2.0 Hz, H8), 7.22 (2H, s, H2' and H6'), 5.93 (1H, d, J=8.0 Hz, H1''), 5.50 (1H, 9.8 and 8.0 Hz, H2''), 4.00 (1H, dd, J=9.8 and 3.2 Hz, H3''), 4.08 (1H, d, J=3.2 Hz, H4''), 3.71 (3H, complex, H5'' and H6''), 7.40 (2H, s, H2''' and H6'''), NMR δ_C (CD₃OD):

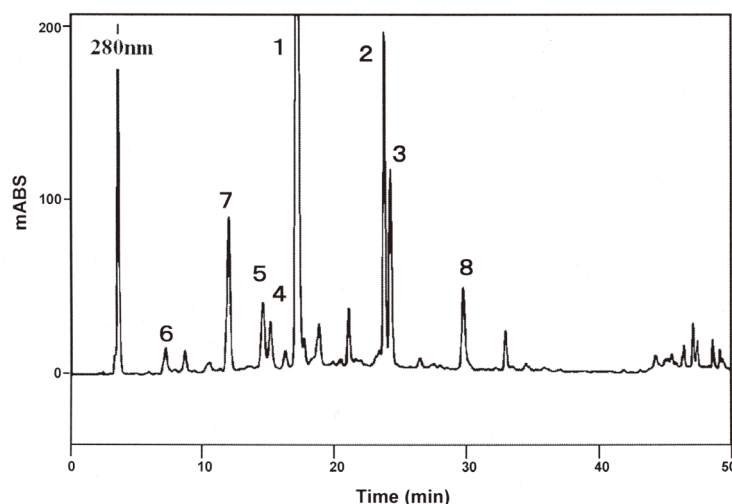


図1 HPLC analytical profile of the ethyl acetate-soluble fraction of the methanol extract of *Myrica rubra*. Analytical Conditions: Column, TSK-GEL ODS-80TS (4.6 ×150 mm); Solvent, A, 0.1% H₃PO₄ aq., B, CH₃CN; Gradient system, a linear gradient from 10% of solv. B to 40% of solv. B (40min) and then 100% of solv. B (50min); Flow rate, 1 ml/min; Detection, 280 nm.

158.1 (C2), 135.3 (C3), 175.4 (C4), 163.0 (C5), 99.6 (C6), 165.5 (C7), 94.4 (C8), 157.9 (C9), 105.8 (10), 121.9 (C1' or C1''), 109.8 (C2' and C6' or C2'' and C6''), 146.3 (C3' and C5' or C3'' and C5''), 137.8 (C4' or C4''), 101.3 (C1'), 74.6 (C2'), 73.4 (C3'), 70.5 (C4'), 77.4 (C5'), 62.0 (C6'), 121.6 (C1'' or C1'), 110.6 (C2'' and C6''), 146.2 (C3'' and C5'' or C3' and C5'), 139.8 (C4'' or C4'), 168.3 (C7''). **6.** $[\alpha]_D^{25} +13^\circ$ (c 0.1, CH₃OH); NMR δ_H (CD₃OD): 4.75 (1H, brs, H2), 4.16 (1H, m, H3), 2.84 (1H, dd, J=16.6 and 4.5 Hz, H4a), 2.72 (1H, dd, J=16.6 and 2.9 Hz), 5.91 (1H, d, J=2.4 Hz, H6), 5.93 (1H, d, J=2.4 Hz, H8), 6.51 (2H, s, H2' and H6'). **7.** $[\alpha]_D^{25} -83^\circ$ (c 0.1, CH₃OH); NMR δ_H (CD₃OD): 4.96 (1H, brs, H2), 5.52 (1H, m, H3), 2.97 (1H, dd, J=17.1 and 4.5 Hz, H4a), 2.84 (1H, dd, J=17.1 and 3.0 Hz, H4b), 5.95 (2H, s, H6 and H8), 6.49 (2H, s, H2' and H6'), 6.94 (2H, s, H2'' and H6''). **8.** NMR δ_H (CDCl₃): 7.55 (2H, m, H2 and H6), 7.41 (3H, m, H3, H4, and H5), 7.79 (1H, d, J=16.1 Hz, H7), 6.46 (1H, d, J=16.1 Hz, H8).

詳細は省略するが、以上のデータから、単離した物質の化学構造を解析した結果、**1**から**5**は、ミリセチンを母核とするフラボノールグリコシドであることが判明し、加えて、**2**, **3**, **5**は、予想通りガロイル化されたものであることがわかった。一方、**6**, **7**は、エピガロカテキンであることがわかり、加えて、その立体化学は、お茶のカテキンと同じものであることがわかった。なお、**7**は、**6**がさらにガロイル化されたエピガロカテキンガラートであることがわかった。一方で、**8**は収量的には多かったが、フェノール基のない桂皮酸であることが判明した(図2)。

3・2 単離物質の活性

ヤマモモより単離できた8種の成分のDPPHラジカルの消去活性、チロシナーゼ阻害活性、リボキシゲナーゼ阻害活性を測定した。その結果を図3にまとめて示した。

図3Aには、各物質5 μ MにおけるDPPHラジカルの消去活性をDPPHによる517 nmの吸光度減少度で示した。化合物**8**は、活性を示さなかったが、他の物質はこの濃度でいずれも消去活性を示した。なお、ガロイル基を有する**2**, **3**, **5**, **7**については、そのラジカル消去能が2倍程度高く、ガロイル基の強いラジカル消去効果が表れたといえる。

図3Bには、各物質のリボキシゲナーゼ阻害活性を示した。8化合物の中では、**7**が最も低濃度で活性を示し、それに**1**と**6**が続いた。一方、**4**, **5**, **8**については、100 μ Mにおいてもほとんど活性を認めなかった。強い活性を示した**6**と**7**は、いずれもエピガロカテキンであり、**7**はさらにカロイル化されているものである。したがって、エピガロカテキン骨格には、リボキシゲナーゼ活性が存在し、それがさらにガロイル化されると、その活性が増強することが示唆された。

図3Cには、チロシナーゼ阻害活性を示した。いずれの化合物も0.1から1 mMにおいて、阻害活性を示したが、特に群を抜いて強力なものはなかった。しかしながら、ガロイル化された**2**, **3**, **5**, **7**については、ガロイル化されていないものより低濃度で強い活性を示し、ガロイル基の活性増強効果があるものと思われた。

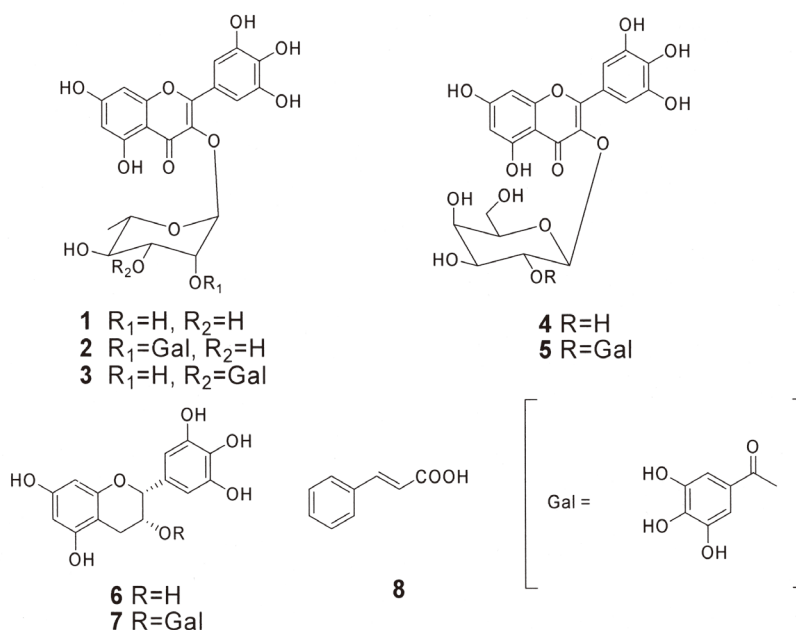


図2 Chemical structures of the isolated compounds **1-8** from the leaves of *Myrica rubra*.

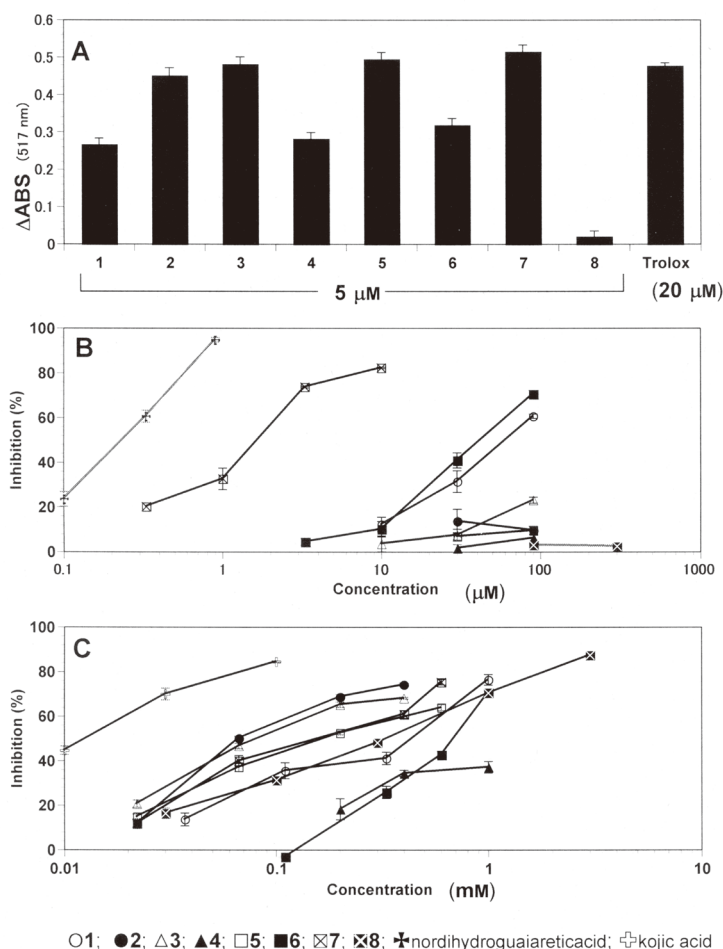


図3 Chemical and enzymatic antioxidant activity of the isolated compounds 1-8 from *Myrica rubra*. Panel A : DPPH radical scavenging activity; Panel B : Lipoxygenase inhibitory activity; panel C : Tyrosinase inhibitory activity. All data are presented as mean $\pm$ S.D. (n=3).

4. 総括

本研究により、四国地区において身近な植物資源であるヤマモモの葉部に各種のガロイル化フラボノイドの存在を確認した。さらに、それらのガロイル化フラボノイドが、ラジカルの消去機能、リポキシゲナーゼやチロシナーゼのような酸化劣化酵素の制御能に優れていることを発見した⁶⁾。なお、今回の結果は、あくまで *in vitro* の結果であるため、実際の皮膚における効果は、いまだ定かではない。今後は、ケラチノサイトやメラノサイトのような皮膚由来の培養細胞系や実際の動物を用いた実験系により、単離したガロイルフラボノイドの効果を検証していくことが必要と思われる。

(参考文献)

- 1) Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y. et al., :Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1749-1754, 1999.
- 2) Masuda, T., Oyama, Y., Inaba, Y. et al., :Antioxidant-

related activities of ethanol extracts from edible and medicinal plants cultivated in Okinawa, Japan. *J. Jpn Soc. Food Sci. Technol.* (in Japanese), **49**, 652-661, 2002.

- 3) Masuda, T., Fujita, N., Odaka, Y. et al., :Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in Okinawa and identification of a at-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2316-2320, 2007.
- 4) Inoue, I., Arai, Y., and Nagai, M. : Diarylheptanoids in the bark of *Myrica rubra* Sieb. et Zucc., *Yakugaku Zasshi* (in Japanese), **104**, 37-41, 1984.
- 5) Ha, T. J., Nihei, K.-I., and Kubo I., :Lipoxygenase inhibitory activities of octyl gallate. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3177-3181, 2004.
- 6) Masuda, T., Someya, T. and Fujimoto, A. :Phenolic inhibitors of chemical and enzymatic oxidation in theleaves of *Myrica rubra*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 212-215, 2010.