

# ソウシジュの葉に含まれるフラボノイド配糖体

世嘉良宏斗、照屋正映、荻貴之、西里さおり、田場涼子

ソウシジュはやせ地でも生育が良いことから緑肥木として沖縄に導入され、現在では街路樹や公園樹としても親しまれている。葉や樹皮などからは 34 種類以上のポリフェノール類が単離・同定されており、台湾ではその抗酸化作用が注目されている。今回、ソウシジュに含まれるポリフェノール類の機能性に着目した新たな香粧品素材を開発するために、葉の 50%エタノール抽出物について総ポリフェノール含量を指標に分析を行った。その結果、総ポリフェノール含量の多い画分から新たに 1 種類のフラボノイド配糖体を単離・同定し、チロシナーゼ阻害活性を確認した。

## 1 はじめに

ソウシジュ（相思樹、*Acacia confusa* Merr.）はフィリピン原産の常緑の大高木で、台湾やマレーシアなど、東南アジア地域に広くみられる。沖縄では明治時代に導入されて以来、街路樹等として知られており<sup>1, 2)</sup>、台湾では薬用植物として伝統的に利用されている<sup>3)</sup>。含有成分については、これまでに葉<sup>4, 5)</sup>、樹皮<sup>6, 7)</sup>、心材<sup>8, 9)</sup>、花<sup>3)</sup>から安息香酸誘導体やミリセチン誘導体など、抗酸化活性を示すポリフェノール類などが報告されている（図 1）。また、葉の 50%エタノール抽出物については、チロシナーゼ阻害活性<sup>10)</sup>やエストロゲン様活性<sup>11)</sup>が報告されている。一方、ポリフェノールの一種であるフラボノイドについても、様々な生理活性が報告されており、最近では皮膚や骨などに対する抗老化作用が注目されている<sup>12)</sup>。

そこで本研究では、ソウシジュに含まれるポリフェノール類の機能性を活用した新たな香粧品素材を開発するために、葉の 50%エタノール抽出物について総ポリフェノール含有量を指標に分析を行い、含有成分のチロ

シナーゼ阻害活性試験を行った。

## 2 実験方法

### 2-1 試薬および機器

抽出及び分液には、脱イオン水、特級エタノール（和光純薬工業）、特級*n*-ブタノール（キシダ化学）、特級メタノール（和光純薬工業）、特級ジクロロメタン（和光純薬工業）を使用した。HPLC用移動相には、超純水、高速液体クロマトグラフ用メタノール（和光純薬工業）、特級メタノール（和光純薬工業）を使用した。

総ポリフェノール含量の測定には、Folin-Ciocalteu 試薬（以下Folin試薬、Merck）、特級炭酸ナトリウム（和光純薬工業）を使用した。

チロシナーゼ阻害試験には、チロシナーゼ（マッシュルーム由来、Sigma-Aldrich）、3,4-dihydroxy-L-phenylalanine（以下DOPA、Sigma-Aldrich）、リン酸水素二ナトリウム（和光純薬工業）、リン酸二水素ナトリウム（関東化学）、特級ジメチルスルホキシド（以下DMSO、和光純薬工業）を使用した。

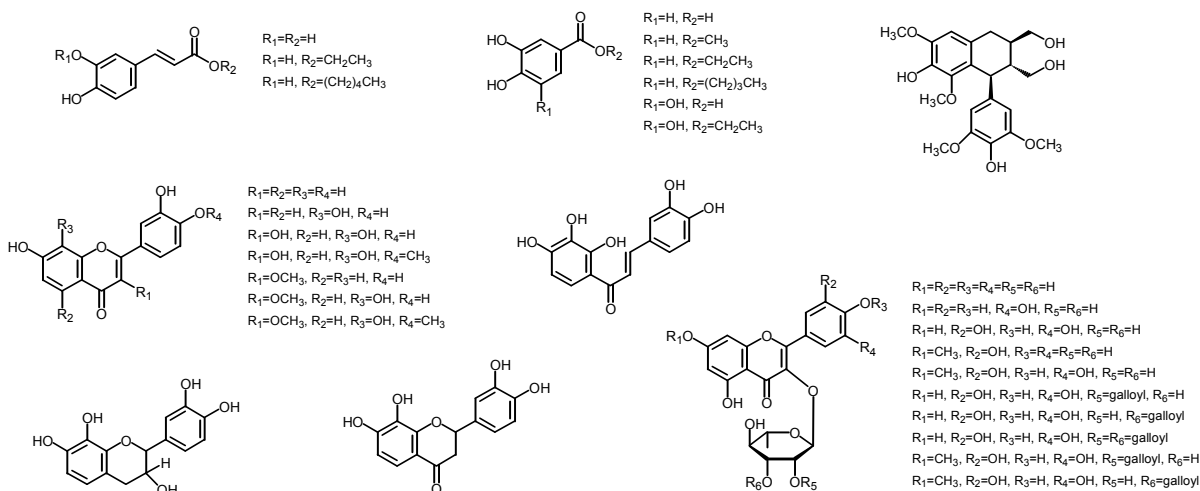


図 1 これまでに報告されているソウシジュのポリフェノール類

HPLC分析は、送液システム (Waters Alliance 2695 Separations Module)、フォトダイオードアレイ検出器 (Waters 996 Photodiode Array Detector)、逆相カラム (Waters Symmetry C18, 7.8×100mm) を用いて行った。

HPLC 分取には、送液システム (Waters 600E Multisolvant Delivery)、サンプルマネージャー (Waters 2767 Sample Manager)、MS 検出器 (Waters Micromass ZQ Detector)、フォトダイオードアレイ検出器 (Waters 996 Photodiode Array Detector)、逆相カラム (Waters Symmetry C18, 19×150mm または YMC-Pack Pro C18 4.6×250mm) を用いて行った。

<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-NMRスペクトルはJNM-LA400 (日本電子) を使用して測定した。

マイクロプレートリーダーは、Bio-Tek instruments ELx 800 Universal Microplate Readerを使用した。

## 2-2 試料

沖縄県工業技術センター敷地内に植栽されているソウシジュの葉を 2008 年 4 月に採取し、試料として用いた。

## 2-3 総ポリフェノール含量測定

総ポリフェノール含量は沖らの方法<sup>13)</sup>に準じて、Folin-Ciocalteu 法で測定した。96 穴ディープウェルプレートの各ウェルに試料溶液 (試料を 50%エタノール溶液で調整) 20μL、イオン交換水 1.2mL、Folin 試薬 100μL、20%炭酸ナトリウム水溶液 300μL を加えて、ピペティングで攪拌した。また、Folin 試薬の代わりにイオン交換水を加えて同様に反応させた系をブランクとした。これを室温で 1 時間以上静置した後、各ウェルから 150μL を 96 穴マイクロプレートに分け移し、マイクロプレートリーダー (655nm) で測定した。

## 2-4 チロシナーゼ阻害試験

チロシナーゼ阻害試験は、既報<sup>10)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、96 穴マイクロプレートの各ウェルに緩衝液 (1/15M リン酸バッファー、pH6.8) 90μL、酵素溶液 (40U/mL チロシナーゼ) 40μL、試料溶液 (試料を 5% DMSO 溶液で調整) 20μL を加え、プレートミキサーで攪拌してから 23℃で 3 分間プレインキュベートした。プレインキュベート後に基質溶液 (2.5mM DOPA) 50μL を添加し、直ちに 490nm における吸光度 (As0) を測定した。さらに 23℃で 10 分間反応を行い、反応後の吸光度 (As10) を測定した。また、試料溶液の代わりに 5% DMSO 溶液を加えた系、および酵素溶液の代わりにイオン交換水を加えた系において同様に反応させ、それぞれの場合における反応開始直後と 10 分

後の吸光度 (Ac0、Ac10 および Ab0、Ab10) を測定した。チロシナーゼ阻害活性は以下の式により算出した。  
チロシナーゼ阻害率 (%) =  
 $100 - \left[ \frac{(As_{10} - Ab_{10}) - (As_0 - Ab_0)}{(Ac_{10} - Ac_0)} \times 100 \right]$

## 2-5 化合物の分離と精製

採取した生葉 (9.0kg) を温風乾燥後 (3.1kg)、粉砕機で粉末化してから 50%エタノール溶液 40L で抽出し、総ポリフェノール含量を指標に分画した。まず、抽出液を減圧濃縮してエタノールを除去した後、ブタノールを加えて分液し、ブタノール層を得た。これを減圧濃縮して溶媒を除去した後、ジクロロメタンと 50%メタノールを加えてさらに分液した。得られた 50%メタノール層を減圧濃縮した後、HPLC を用いて粗分画を行い、5 個のフラクション (Fr.16~20) を得た。Fr.16 および 17 については、さらに HPLC で精製し、化合物 1 (収率 0.33%) および化合物 2 (収率 0.27%) を得た。

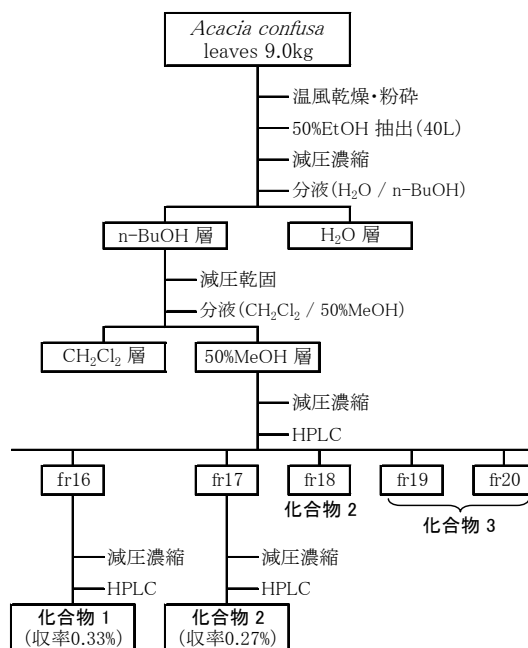


図2 化合物の分離フローチャート

## 3 実験結果と考察

### 3-1 化合物 1 の同定

化合物 1 は、ESI-MS による分子イオンピーク  $m/z$  481 (M+H)<sup>+</sup> を示した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルは 1 個のアノマープロトン [ $\delta$  5.33 (1H, d,  $J=8.0$ )], 4 個の芳香族プロトン [ $\delta$  6.18, 6.36 (each 1H, d,  $J=2.0$ ), 7.18 (2H, s)] によるシグナルを示した。また、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルは 1 個のメチレン炭素、4 個のメチン炭素、15 個の複素

芳香族炭素、1個のアノマー炭素によるシグナルを示した。以上のことから、化合物1は分子量480のミリセチン配糖体と推定された。そこで<sup>13</sup>C-NMRスペクトルデータを既知化合物1aの文献値<sup>14)</sup>と比較した結果、化合物1をmyricetin 3-O-β-galactopyranosideと同定した。

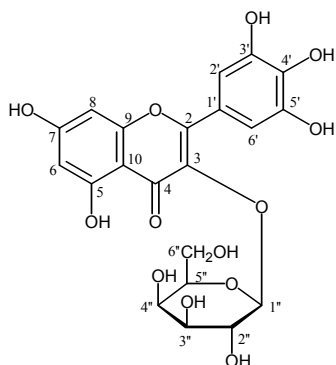


図3 化合物1 (1a) の構造

### 3-2 化合物2の同定

化合物2は、ESI-MSによる分子イオンピーク m/z 465 (M+H)<sup>+</sup>を示した。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは1個のメ

チル基 [δ 0.83 (3H, d, J=6.0)], 1個のアノマープロトン [δ 5.18 (1H, br)], 4個の芳香族プロトン [δ 6.18, 6.35 (each 1H, d, J=2.0), 6.87 (2H, s)]によるシグナルを示した。また、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは1個のメチル炭素、4個のメチン炭素、15個の複素芳香族炭素、1個のアノマー炭素によるシグナルを示した。以上のことから、化合物2は分子量464のミリセチン配糖体と推定された。そこで<sup>13</sup>C-NMRスペクトルデータを既知化合物2aの文献値<sup>15)</sup>と比較した結果、化合物2をmyricetin 3-O-α-rhamnopyranosideと同定した。

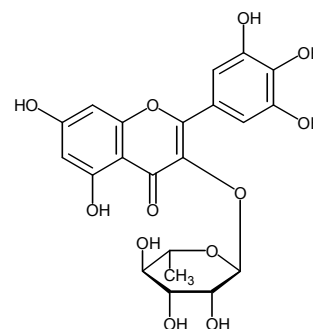


図4 化合物2 (2a) の構造

表1 化合物1と1a<sup>14)</sup>、2と2a<sup>15)</sup>、3と3a<sup>16)</sup>の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルデータ比較

Position	1 <sup>a)</sup>	1a <sup>b)</sup>	2 <sup>a)</sup>	2a <sup>c)</sup>	3 <sup>a)</sup>	3a <sup>d)</sup>
C-2	156.28	ND	157.51	159.2	157.51	158.3
C-3	133.75	134.5	134.28	136.1	133.32	134.9
C-4	177.39	ND	177.80	179.5	177.45	178.9
C-5	161.23	161.7	161.31	163.1	161.26	162.5
C-6	98.74	98.4	98.67	99.7	98.32	99.4
C-7	164.44	165.0	164.17	164.0	164.22	164.8
C-8	93.42	93.2	93.52	94.6	93.57	94.4
C-9	156.14	157.1	156.41	158.4	156.41	157.8
C-10	103.80	104.1	104.05	105.6	103.97	105.5
C-1'	119.96	120.1	119.60	121.7	119.24 <sup>*)</sup>	121.5
C-2', -6'	108.54	108.4	107.90	109.4	108.86	110.0
C-3', -5'	145.42	145.0	145.78	146.7	145.79	146.4
C-4'	136.75	136.9	136.46	137.7	136.56	137.1
C-1''	102.06	102.4	101.94	103.5	98.72	99.5
C-2''	71.21	71.7	70.02	71.7	71.68	72.7
C-3''	73.30	73.6	70.57	72.0	68.54	70.4
C-4''	68.02	68.7	71.27	73.2	71.75	73.5
C-5''	75.96	75.8	70.38	71.9	70.66	71.5
C-6''	60.05	60.6	17.53	17.5	17.57	17.1
C-1'''					119.39 <sup>*)</sup>	121.5
C-2''', -6'''					107.93	109.2
C-3''', -5'''					145.45	145.9
C-4'''					138.55	138.4
C-7'''					164.98	165.9

a) Measured in DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz

b) Measured in CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz

c) Measured in CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz

d) Measured in acetone-d<sub>6</sub>, 75 MHz

ND : not detected.

\*) Each values interchangeable.

### 3-3 化合物 3

化合物 3 は、ESI-MS による分子イオンピーク  $m/z$  615 (M-H)<sup>-</sup> を示した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルは 1 個のメチル基 [ $\delta$  0.92 (3H, d,  $J=5.6$ )], 1 個のアノマープロトン [ $\delta$  5.50 (1H, d,  $J=1.6$ ) ], 6 個の芳香族プロトン [ $\delta$  6.20, 6.37 (each 1H, d,  $J=2.0$ ), 6.92 (2H, s), 6.94 (2H, s) ] によるシグナルを示した。また、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルは 1 個のメチル炭素、4 個のメチン炭素、21 個の複素芳香族炭素、1 個のカルボニル炭素、1 個のアノマー炭素によるシグナルを示した。以上のことから、化合物 3 は分子量 616 のミリセチン配糖体と推定された。そこで <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータを既知化合物 3a の文献値<sup>16)</sup> と比較した結果、化合物 3 を myricetin 3-O-(2"-O-galloyl)- $\alpha$ -rhamnopyranoside と同定した。

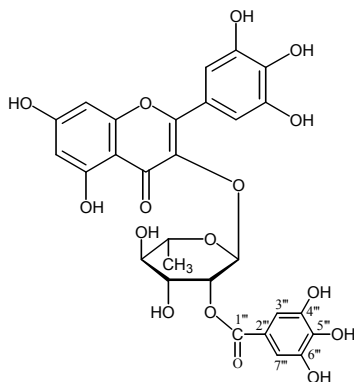


図 5 化合物 3 (3a) の構造

### 3-4 単離化合物のチロシナーゼ阻害活性試験

単離した化合物 1 および 2 について、チロシナーゼ阻害活性試験を行った結果、化合物 1 (470 $\mu$ M) が 45%、化合物 2 (410 $\mu$ M) が 52% のチロシナーゼ阻害率を示した。

表 2 チロシナーゼ阻害活性

	チロシナーゼ阻害率 (終濃度)
化合物 1	45 % (469 $\mu$ M)
化合物 2	52 % (408 $\mu$ M)
コウジ酸	49 % (35 $\mu$ M)

## 4 まとめ

ソウシジュの葉を 50%エタノールで抽出し、分液および HPLC により分画した結果、総ポリフェノール含量の多い画分から 3 種類のフラボノイド配糖体 (myricetin 3-O- $\beta$ -galactopyranoside、myricetin 3-O- $\alpha$ -

rhamnopyranoside および myricetin 3-O-(2"-O-galloyl)- $\alpha$ -rhamnopyranoside) を同定した。このうち myricetin 3-O- $\beta$ -galactopyranoside は、今回初めてソウシジュから単離された。また、単離した 2 種類のフラボノイド配糖体について、チロシナーゼ阻害活性試験を行った結果、myricetin 3-O- $\beta$ -galactopyranoside (470 $\mu$ M) が 45%、myricetin 3-O- $\alpha$ -rhamnopyranoside (410 $\mu$ M) が 52% の阻害率を示した。

今回の結果から、葉の 50%エタノール抽出物にはポリフェノールの一種であるフラボノイドが含まれており、そのフラボノイドはチロシナーゼ阻害活性を示すことが明らかになった。フラボノイドは機能性香粧品の有効成分としても利用されており、ソウシジュの新たな香粧品素材としての活用が期待できる。

## 参考文献

- 堀田満他編, 世界有用植物事典, 平凡社, 30, (1989).
- 財産法人海洋博覧会記念公園管理財団編, 沖縄の都市緑化植物図鑑, 財産法人海洋博覧会記念公園管理財団, 130, (1997).
- Wu, Jyh-Horng; Huang, Chih-Yu; Tung, Yu-Tang; Chang, Shang-Tzen., Online RP-HPLC-DPPH Screening Method for Detection Radical-Scavenging Phytochemicals from Flowers of *Acacia confusa*, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 328–332, (2008).
- Lee, Tzong-Huei; Liu, Der-Zen; Hsu, Feng-Lin; Wu, Wen-Chung; Hou, Wen-Chi., Structure-activity relationships of five myricetin galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*, *Botanical Studies*, **47**, 37–43, (2006).
- Chou, Chang-Hung; Fu, Chiu-Yu; Li, Shin-Yi; Wang, Yu-Fa., Allelopathic potential of *Acacia confusa* and related species in Taiwan. *J. Chem. Ecol.*, **24**, 2131–2154, (1998).
- Tung, Yu-Tang; Wu, Jyh-Horng; Huang, Chih-Yu; Kuo, Yueh-Hsiung; Chang, Shang-Tzen., Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa*, *Bioresource Technology*, **100**, 509–514, (2008).
- 石井稔, 大島康義, 相思樹タンニンの化学的研究, 日農化, **16**, 476–478, (1946).
- Wu, Jyh-Horng; Tung, Yu-Tang; Chien, Shih-Chang; Wang, Sheng-Yang; Kuo, Yueh-Hsiung; Shyur, Lie-Fen; Chang, Shang-Tzen., Effect of Phytochemicals from the Heartwood of *Acacia confusa* on Inflammatory Mediator Production, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1567–1573, (2008).
- Wu, Jyh-Horng; Tung, Yu-Tang; Wang, Sheng-Yang; Shyur, Lie-Fen; Kuo, Yueh-Hsiung; Chang, Shang-Tzen. Phenolic Antioxidants from the Heartwood of *Acacia confusa*, *J.*

- Agric. Food Chem.*, **53**, 5917–5921, (2005).
- 10) 豊川哲也, 与那嶺都乃, 沖縄県植物のチロシナーゼ阻害活性, 沖縄県工業技術センター研究報告第10号, 61–63, (2008).
  - 11) 平成18年度沖縄産学官共同研究推進事業「熱帯植物のエストロゲンを活用した天然機能性化粧品の開発」成果報告書, (2007).
  - 12) 有井雅幸, 抗老化原料として的大豆イソフラボンアグリコンの特性と機能, *Fragrance Journal*, 75–81, (2004).
  - 13) 沖智之, 増田真美, 納美由紀, 小林美緒, 吉田収, 西場洋一, 須田郁夫, サツマイモ「シモン1号」葉部熱水抽出液のラジカル消去活性, *食科工*, **49**, 683–687, (2002)
  - 14) N. Castillo-Muñoz, S. Gómez-Alonso, E. García-Romeo, M. V. Gómez, A. H. Velders, I. Hermosín-Gutiérrez, Flavonol 3-*O*-Glycoside Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 209–219, (2009).
  - 15) S. K. Chung, Y. C. Kim, Y. Takaya, K. Terashima, M. Niwa, Novel Flavonol Glycoside, 7-*O*-Methyl Mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and Its Antioxidant Effect, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4664–4668, (2004).
  - 16) M. Furusawa, T. Ito, K. Nakaya, T. Tanaka, I. Ibrahim, M. Iinuma, H. Murata, Y. Inatomi, T. Nakanishi, Flavonol Glycosides in Two *Diospyros* Plants and their Radical Scavenging Activity, *Heterocycles*, **60**, 2557–2563, (2003).

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。