大麦若葉から分離したルトナリンの 抗酸化作用

上山英夫[§], 青塚康幸, 大川雅史*, 小倉洋子,
筈口桃江, 帆足和憲, 金城順英*

日本薬品開発株式会社
* 福岡大学薬学部生薬学研究室

Antioxidant Activities of Lutonarin
Isolated from Young Barley Leaves

Hideo Ueyama[§], Yasuyuki Aotsuka, Masafumi Okawa*,
Yoko Ogura, Momoe Ukeguchi,
Kazunori Hoashi and Junei Kinjo*

JPD Co., Ltd., 7-98 Kita-Itami, Itami-shi, Hyogo 664-0831
* Faculty of Pharmaceutical Sciences Fukuoka University,
8-19-1, Nanakuma, Fukuoka 814-0180

Lutonarin was isolated from young barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook) leaves. It has been suggested that lutonarin found in plants, especially in leaves, plays a role in removing reactive oxygen species⁶⁾. In this study, we examined the antioxidative effects of lutonarin and related flavones against the free radical DPPH and Fenton's reaction *in vitro*. The DPPH radical-scavenging activity was higher in the flavones with a catechol structure in the B-ring of the flavone compared to those in which the B-ring contained only a single hydroxyl molecule. Furthermore, the higher DPPH radical scavenging activity of saponarin compared to apigenin suggests that the 6-C-and/or 7-O-glucosyl moiety in saponarin stimulates its radical scavenging activity. In a comparison of lutonarin with luteolin, the inhibitory action against the oxidation of ethyl linoleate by Fenton's reaction appeared to be weakened by the 6-C-and/or 7-O-glucosyl moiety.

(Received Oct. 14, 2010; Accepted Dec. 29, 2010)

Keywords: barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves, lutonarin, saponarin, DPPH radical, Fenton's reaction

キーワード: 大麦若葉, ルトナリン, サポナリン, DPPH ラジカル, Fenton 反応

大麦 (*Hordeum vulgare* L.) は世界各国で栽培されている重要な食糧資源であり, 種子および葉部に関する研究は多い. 大麦若葉のフラボノイドに関しては, 植物生理学の観点およびその探索について行われてきた. 大麦若葉のフラボノイドの主要な成分としては, サポナリン, ルトナリンおよびその誘導体が報告されている^{1)~8)}.

大麦若葉中のルトナリンの含有量は栽培条件により変動

し¹⁾²⁾, サポナリンとルトナリンの蓄積量は UV-B 照射により増大することが報告されている²⁾⁴⁾. ルトナリンは UV-B に対するスクリーン効果よりも酸素ラジカルの消去への関与が示唆されている⁴⁾. *In vitro* における実験としては, 大麦若葉から分離されたルトナリンとサポナリンの混合物による生体由来の脂質に対する抗酸化活性が報告されている⁶⁾. そこで本報告においては, ルトナリンによる DPPH ラジカルの消去活性, Fenton 反応に対する消去活性, 構造の類似するフラボノイドおよびその糖鎖の効果について比較した.

1. 実験方法

(1) 試薬

アピゲニン, ルテオリン, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), アセトニトリル, 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH), ブチルヒドロキシトルエン (BHT), ジメチルスルホキシド (DMSO) は和光純薬工業(株), トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンはキシダ化学(株), チオバルビツール酸 (TBA), フェナジメトサルフェート (PMS) はナカライテスク(株) から購入した.

(2) 大麦若葉搾汁液の分画

本実験に用いた大麦の品種は *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook であり, 大分県北部地方で栽培され, 大麦若葉は冬期に収穫された. 草丈 20~35 cm の若葉の搾汁液の噴霧乾燥物 500 g を水 3000 ml で熱水抽出後, 抽出物を Amberlite XAD-2 (Rohm and Haas 社製) カラム (1000 ml 容) に吸着後, H₂O, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% メタノール水溶液, およびメタノールの各 1000 ml を用いたステップワイズ分画を行い, リノール酸エチルを基質とする Fenton 反応に対する阻害活性を指標として分画した. メタノール水溶液の 30~40% 溶出画分の減圧濃縮液を冷蔵庫保存して析出した不定形物質のメタノールによる再析出を繰り返した. 得られた標品を 60% メタノール水溶液に溶解し, メタノールを留去後, Amberlite XAD-2 による再クロマトを行い, 30% メタノール水溶液画分をメタノールによる再析出後, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定で純度 99.4% 以上の淡黄色物質 240 mg を得た. HPLC は, 島津製作所製 CLASS-LC10 に Inertsil ODS-3 (4.6×250 mm) (GL サイエンス社製) カラムを適用し, 流速: 0.5 ml/min, 波長: 336 nm, カラム温度: 40℃, 移動相としては 1% 酢酸 (pH 4): アセトニトリル=4:1, 試料濃度: 40 μg/ml (移動相に溶解) の条件により行った.

(3) 構造決定

質量スペクトルは FAB-MS: JMS-SXI02A 型質量分析装置 (日本電子(株) 製) を用いて, negative FAB-MS にて測定した. 標品の ¹H-NMR スペクトル (500 MHz) を JEOL α-500 型核磁気共鳴装置スペクトル吸収測定装置 (日本電子(株) 製) により, 溶媒として DMSO を用いて測定し, ¹³C-NMR スペクトル (100 MHz) を JEOLGX-400 型核磁気共鳴

〒664-0831 兵庫県伊丹市北伊丹 7-98

* 〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈 8-19-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), ueyama.h@jpd.gr.jp

スペクトル吸収測定装置（日本電子（株）製）により溶媒として DMSO を用いて測定した。

(4) DPPH ラジカルの消去活性⁷⁾

DPPH の 1.1×10^{-4} M エタノール溶液を 1.5 ml 容石英セルに 1.35 ml 分注して、各セルに所定の濃度の抗酸化物質の溶液 0.15 ml を注加し、DPPH ラジカルの消去活性を分光光度計 HITACHI U-3000 により、反応 20 分後の DPPH の 517 nm の吸光度の減少量により測定した。抗酸化物質の濃度の対数を横軸に、縦軸に消去活性をプロットし、50% 消去活性に対する抗酸化物質の濃度を IC₅₀ として記載した。

(5) Fenton 反応⁹⁾

リノール酸エチル 50 μ l, 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 0.2% SDS 溶液 5 ml, 20 mM FeCl₂ 水溶液 50 μ l および 10 mM 過酸化水素水溶液 50 μ l の混合溶液に、DMSO に溶解した 30 mM 抗酸化物質 100 μ l を添加し、37°C で 16 時間反応させた。対照として、DMSO の 100 μ l を添加した反応系を用いた。反応溶液 200 μ l に 4% BHT 溶液 50 μ l, 8% SDS 溶液 200 μ l, TBA 試薬 (TBA 0.67 g/H₂O 100 ml) と 100 mM, pH 3.5 酢酸緩衝液 1.5 ml 混合溶液 3 ml を加え、沸騰浴中で 20 分間加熱し、冷却後、n-ブタノール：メタノール=9：1 を 5 ml 添加して混合し、2000 rpm, 10 分間遠心後、その上層の 532 nm の吸光度を分光光度計 HITACHI U-3000 により測定した。阻害率は (対照の OD_{532 nm} - 各試料に対応する OD_{532 nm} / 対照の OD_{532 nm}) $\times$ 100 (%) により表示した。

2. 実験結果および考察

(1) 大麦若葉搾汁液のルトナリンとサポナリンの存在比
大麦若葉搾汁液のサポナリンとルトナリンの比率を

HPLC により測定し、Fig. 1 に示すように 6.8 : 1 の存在比を得た。この存在比は栽培時期により変動する。

(2) 抗酸化活性成分の物理化学的性質

精製標品の紫外線吸収スペクトルは、水溶液では 270 nm, 347 nm, メタノール溶液では 270 nm, 350 nm に吸収極大を示した。融点は 229~231°C であった。本物質はエチルエーテル、ベンゼン、n-ヘキサン、クロロホルムに不溶性であり、メタノール、エタノールには難溶、アセトン、プロピレングリコール、水、DMSO に可溶性であった。

(3) 構造決定

精製標品の赤外線吸収スペクトル (KBr 法) では 3400 cm⁻¹, 1612 cm⁻¹ に吸収を示した。

Negative FAB-MS において *m/z* 609 に [M-H]⁻ の分子イオンピークが観察され、分子量は 610 と決定した。¹H,

Fig. 1 HPLC profile of young barley extract

Table 1 Spectra of ¹H-NMR and ¹³C-NMR of lutionarin

Carbon No.	Signal 1	Signal 2	Lit ³⁾	Carbon No.	Signal 1	Signal 2	Lit ³⁾
2		164.2	164.2	1''	4.68 d	73.5	73.3
3	6.70 s	103.1	101.1	2''		70.7	72.6
4		181.7	181.7	3''		78.8	78.3
5		159.5	160.1	4''		70.4	69.5
6		110.7	110.2	5''		80.8	80.5
7		162.0	162.2	6''		60.8	60.6
8	6.83 s	93.7	93.8	1'''	4.97 d	101.3	101.1
9		156.2	156.2	2'''		72.7	73.5
10		105.0	104.7	3'''		78.8	74.9
1'		121.3	121.1	4'''		69.7	69.4
2'	7.41-7.43 m	113.4	113.0	5'''		77.0	73.3
3'		145.5	149.3	6'''		60.8	60.2
4'		149.6	159.2				
5'	6.91 d	115.9	115.8				
6'	7.41-7.43 m	118.8	118.6				

Signal 1 : ¹H-NMR

Signal 2 : ¹³C-NMR

Lit : Literal value

Table 2 DPPH radical - Scavenging activity of flavons.

Compound	IC ₅₀ (μM)
Lutonarin	13.6±5.7
Rutin	15.7±2.5
Luteolin	12.3±1.2
Saponarin	1216.7±76.4
Apigenin	8000.0±2645.8

Each value represents the mean±SD (n=3)

¹³C-NMR スペクトルは常温では複雑なシグナルが観察されたが、60℃に昇温して測定を行うことにより帰属が可能となり、各データを文献値³⁾としてルテオリン、6-C,7-O-ジグルコシド、(イソオリエンチン-7-O-β-D-グルコシド)即ちルトナリンと同定した。NMRの測定値と文献値をTable 1に示した。

(4) DPPH ラジカルの消去活性

Table 2にルトナリン、ルテオリン、ルチン、サポナリンおよびアピゲニンによるDPPHラジカルの消去活性を示した。構造式と活性の比較から、DPPHラジカルの消去活性にはB環のカテコール構造が重要であることが示唆された。ルトナリン、ルテオリンおよびルチンの測定値からは、6-C位および/または7-O位のグルコシル基の効果は、明確に認められないが、サポナリンとアピゲニンの比較から、6-C位および/または7-O位のグルコシル基の関与が示唆された。

(5) Fenton 反応に対する阻害活性

Fenton 反応によるリノール酸エチルの酸化に対するルトナリン、ルテオリンおよびルチン阻害率は45.7±3.4%、83.0±8.2%および63.0±19.3%であった。ルトナリンの阻害率は、ルテオリン、ルチンよりも低い数値を示し、阻害活性に対する6-C位および/または7-O位のグルコシル基による阻害活性に対する妨害が示唆された。

3. 要 約

大麦 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook) の若葉から、ルトナリンを分離した。ルトナリンの *in vitro* における抗酸化効果を検討した結果、DPPH ラジカルの消去活性に対して、B 環のカテコール構造の関与が示唆され、また

サポナリンとアピゲニンの比較から、6-C位および/または7-O位のグルコシル基の関与も示唆された。Fenton 反応によるリノール酸エチルの酸化に対するルトナリンの抗酸化活性に対しては、6-C位および/または7-O位のグルコシル基による妨害が示唆された。

文 献

- 1) Seikel, M.K. and Bushnell, A.J., The flavonoid constituents of barley (*Hordeum vulgare*). II. Lutonarin. *J. Org. Chem.*, **24**, 1995-1997 (1959).
- 2) Reuber, S., Bornman, J.F. and Weissenböck, G., A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. *Plant, Cell and Environment*, **19**, 593-601 (1996).
- 3) Nørbæk, R., Brandt, K. and Kondo, T., Identification of flavone C-glycosides including a new flavonoid chromophore from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) by improved NMR techniques. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1703-1707 (2000).
- 4) Schmitz-Hoerner, R. and Weissenböck, G., Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry*, **64**, 243-255 (2003).
- 5) Ferreres, F., Andrade, P.B., Valentão, P. and Gil-Izquierdo, A., Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1182**, 56-64 (2008).
- 6) Benedet, J.A., Umeda, H. and Shibamoto, T., Antioxidant activity of flavonoids isolated from young green barley leaves toward biological lipid samples. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5499-5504 (2007).
- 7) Ohkawa, M., Kinjo, J., Hagiwara, Y., Hagiwara, H., Ueyama, H., Nakamura, K., Ishikawa, R., Ono, M. and Nohara, T., Three new anti-oxidative saponarin analogs from young green barley leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1887-1890 (1998).
- 8) 萩原義秀, 萩原秀昭, 上山英夫, 大麦若葉青汁粉末の生理機能性物質, 食科工, **48**, 712-725 (2001).
- 9) Osawa, T., Katsuzaki, H., Hagiwara, Y., Hagiwara, H. and Shibamoto, T., A novel antioxidant isolated from young green barley leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1135-1138 (1992).

(平成 22 年 10 月 14 日受付, 平成 22 年 12 月 29 日受理)