

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-56651
(P2008-56651A)

(43) 公開日 平成20年3月13日(2008.3.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 31/05 (2006.01)	A61K 31/05	4C057
A61K 31/7034 (2006.01)	A61K 31/7034	4C083
C07H 15/203 (2006.01)	C07H 15/203 CSP	4C086
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 111	4C206
A61P 17/00 (2006.01)	A61P 17/00	4H006

審査請求 未請求 請求項の数 9 OL (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-330017 (P2006-330017)
 (22) 出願日 平成18年12月6日 (2006.12.6)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-211538 (P2006-211538)
 (32) 優先日 平成18年8月3日 (2006.8.3)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成18年9月15日 平間正博発行の「第48会天然有機化合物討論会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 304036743
 国立大学法人宇都宮大学
 栃木県宇都宮市峰町350番地
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (74) 代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次
 (74) 代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作
 (74) 代理人 100123168
 弁理士 大▲高▼ とし子
 (74) 代理人 100120086
 弁理士 ▲高▼津 一也
 (74) 代理人 100131093
 弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チロシナーゼの活性阻害剤とその製造方法

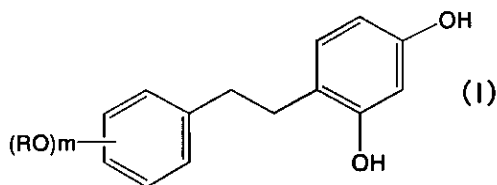
(57) 【要約】

【課題】フェノール類の成分が段階的に着色・ポリマー化する際にその化学反応を促進させる酸化還元酵素であるチロシナーゼの酵素機能を阻害する化合物を提供すること。

【解決手段】

式 (I)

【化1】



(式中、Rは、水素原子又はグリコシル基を表わし、mは1又は2を表し、mが2の場合、Rは、同一又は異なっていてもよい)

で示されるビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤。

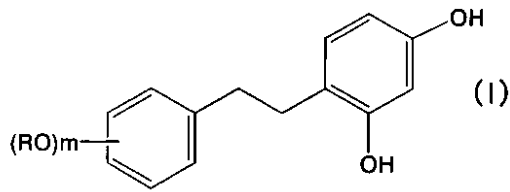
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I)

【化 1】



10

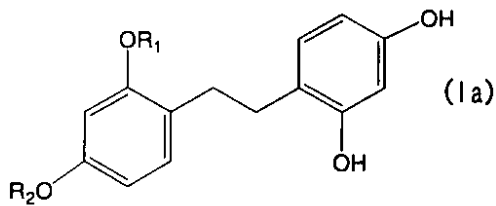
(式中、R は、水素原子又はグリコシル基を表わし、m は 1 又は 2 を表し、m が 2 の場合、R は、同一又は異なってもよい)

で示されるビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤。

【請求項 2】

式 (I) で示される化合物が、式 (I a)

【化 2】



20

(式中、R₁ 及び R₂ は、同一又は異なって、水素原子又はグリコシル基を表わす)

であることを特徴とする請求項 1 記載のビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤。

【請求項 3】

グリコシル基が、五単糖残基であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤。

30

【請求項 4】

五炭糖残基が、キシロシル基であることを特徴とする請求項 3 記載のビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤。

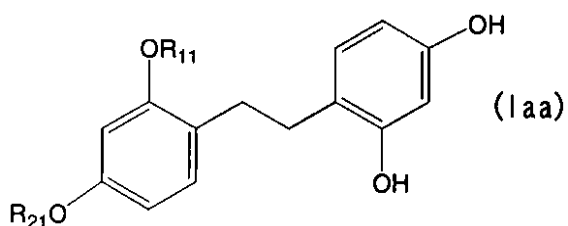
【請求項 5】

R₁ がキシロシル基を、R₂ が水素原子であるか、R₁ 及び R₂ が共にキシロシル基であるか、R₁ が水素原子を、R₂ がキシロシル基であるか、又は、R₁ 及び R₂ が共に水素原子であることを特徴とする請求項 2 記載のビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤。

【請求項 6】

式 (I a a)

【化 3】



40

(式中、R₁₁ はキシロシル基を表し、R₁₂ は水素原子又はキシロシル基を表す) で表

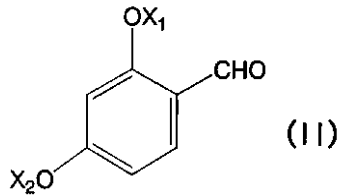
50

されるビベンジル誘導体。

【請求項 7】

2, 4 - ジヒドロキシベンズアルデヒドを出発物質として、該化合物から得られる式 (I)

【化 4】

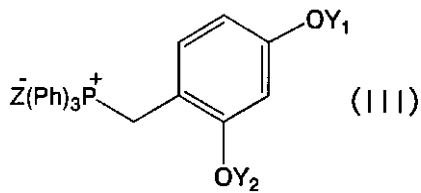


10

(式中、 X_1 及び X_2 は、同一又は異なって、水酸基の保護基を表す)

で表されるベンズアルデヒド誘導体と、同じく、2, 4 - ジヒドロキシベンズアルデヒドから得られる式 (III)

【化 5】

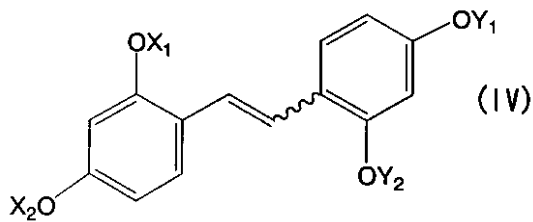


20

(式中、 Y_1 及び Y_2 は、同一又は異なって、水酸基の保護基を表し、 Z はハロゲン原子を表す)

で表されるホスホニウム塩とを、ウィッティッヒ (Wittig) 反応条件下に反応させ、式 (IV)

【化 6】

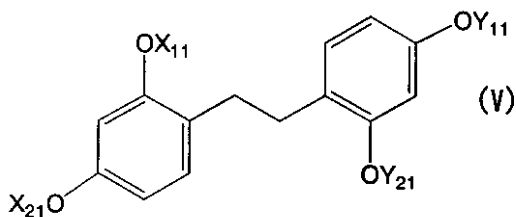


30

(式中、 X_1 、 X_2 、 Y_1 及び Y_2 は、前記と同義である)

で表されるスチルベン誘導体を得、次いで、式 (IV) で表される化合物を水素添加反応に付すことにより、式 (V)

【化 7】



40

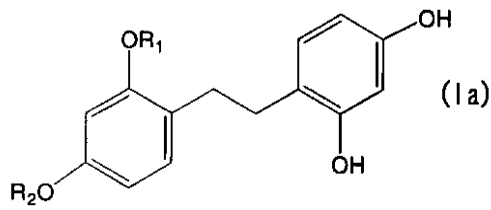
(式中、 X_{11} 、 X_{21} 、 Y_{11} 及び Y_{21} は、同一又は異なって、水素原子又は水酸基

50

の保護基を表す)

で表されるビベンジル誘導体を製造する工程を含む、式 (I a)

【化 8】



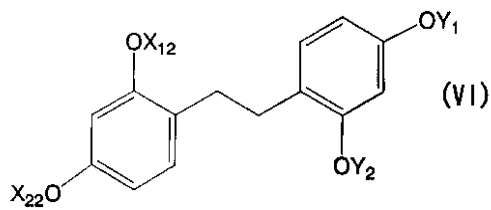
10

(式中、 R_1 及び R_2 は、同一又は異なって、水素原子又はグリコシル基を表わす)
で表されるビベンジル誘導体の製造方法。

【請求項 8】

式 (V I)

【化 9】

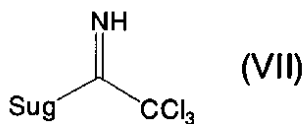


20

(式中、 X_{12} 及び X_{22} の少なくとも 1 つは水素原子を表し、他は水酸基の保護基を表し、 Y_1 及び Y_2 は、前記と同義である)

で表されるビベンジル誘導体をアグリコン部分として、式 (V I I)

【化 1 0】

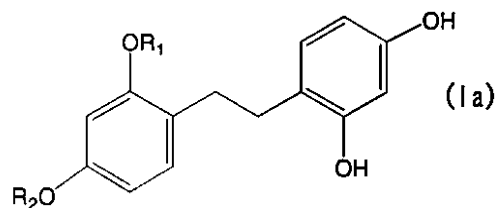


30

(式中、 Sug は、糖残基の官能基が保護されたグリコシル基を表す)

で表されるイミデートでグリコシル化し、次いで、保護基を脱離することからなる、式 (I a)

【化 1 1】



40

(式中、 R_1 及び R_2 は、前記と同義である)

で表されるビベンジル誘導体の製造方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載のチロシナーゼの活性阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする美白剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明はフェノール類の成分が段階的に着色・ポリマー化する際にその化学反応を促進させる酸化還元酵素であるチロシナーゼに対して、その酵素機能を阻害する機能を持つレゾルシノール誘導体と結合したピベンジル誘導体を含有するチロシナーゼの活性阻害剤とその製造方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

酸化還元酵素のポリフェノールオキシダーゼ（チロシナーゼを含む）は動植物の細胞構成組織に含まれるフェノール類の化学反応を促進させる作用があり、人の皮膚では褐色化（日焼け）を引き起こし、青果類や魚介類などの食品では褐変による商品価値の低下や食品に含まれる有益な抗酸化活性のあるポリフェノール類を分解し、昆虫では外皮に含まれるフェノール成分を化学変化させることによって変態して成虫になれることが知られている。

10

このように、ポリフェノールオキシダーゼは動植物におけるフェノール類の着色・ポリマー化現象の初期反応を触媒する酸化還元酵素として知られている。

【0003】

例えば、日焼けが起きる仕組みは、過剰紫外線によって皮膚基底層の色素細胞（メラノサイト）が活性化しチロシンから生成した過剰のメラニンが皮膚に沈着する現象であるが、キシロンからドーパ、ドーパキノン、メラニンへと段階的に化学変化する過程で、酵素であるポリフェノールオキシダーゼが触媒として作用する。その際にその変化は濃度が濃くなる方向に褐色化が進んで行き、その結果、人の顔ではシミやソバカスができ、手足などの皮膚は褐色に日焼けする。

20

原因となる褐色色素であるメラニンは動植物に広く分布しており、弱いながらも紫外線を吸収する性質を持っているため、動物の皮膚や表皮を紫外線から守る役割を果たしているが、過剰なメラニン色素の沈着はシミやソバカスの原因となり、肌の老化を促進するとともにそのときの過剰紫外線による細胞の損傷は皮膚がんの主因ともなっている。

動植物における色素形成反応の初期段階には、チロシナーゼ（ポリフェノールオキシダーゼ）が深く関与している。チロシナーゼは、活性中心に銅を含む酸化還元酵素で、モノフェノールの o -ヒドロキシ化と、 o -ジフェノールの o -キノンへの酸化という2つの連続した反応を触媒する。最終的に、 o -キノン由来の重合体が褐色色素となる。すなわち、これらの色素形成を抑制するためには、チロシナーゼの働きを阻害する必要がある。このようなチロシナーゼのポリマー化現象に係る触媒機能を阻害するための物質として、従来、コウジ酸、ビタミンC、ヒドロキノン、アルブチン、ヘキシルレゾルシノールなどがチロシナーゼ阻害剤として用いられてきた。

30

【0004】

このうちコウジ酸は、日本では、日焼けや褐変を防ぐものとして古くから化粧品や食品に添加されてきたが、発がん性も認められるとの理由で、現在では使用禁止薬物に指定されており使用はされていない。

また、ビタミンCやヒドロキノンは人への毒性はないが色素形成が抑制できる。この色素形成の抑制は、フェノール類の着色・ポリマー化現象を促進するチロシナーゼの触媒機能の阻害によるものではなく、着色・ポリマー化する過程でチロシナーゼで生成されたドーパキノンをドーパ（DOPA）に還元することによって色素の形成を抑制するものである。

40

【0005】

さらに、アルブチン及び下記特許文献1に開示されたヘキシルレゾルシノールなどのレゾルシノール構造と水溶性の性質を兼ね備えたチロシナーゼの触媒機能を阻害する化合物が、コウジ酸に代わる美白化粧剤として提案されている。その他、新規成分であるピペロナルドオキシムまたはその誘導体

【0006】

【特許文献1】特開2006-124358号公報

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そのレゾルシノール構造の化合物のうちアルブチンは美白化粧品に用いたとき、高い水溶性のために細胞毒性が低い点は評価できてもチロシナーゼ阻害活性が弱いという点ではあまり評価されていない。また、上記特許文献1に開示されたヘキシルレゾルシノール誘導体は、環境ホルモンのノニルフェノールと構造が類似し、強いチロシナーゼの活性阻害剤としての機能が認められているが、水溶性が低く細胞毒性が疑われている。そこで、本発明の課題は、動植物が持つフェノール類を段階的に着色・ポリマー化させるチロシナーゼ(EC1.14.18.1)の活性に対して高い阻害効果が得られ、生命体である動植物に対する毒性が少ないチロシナーゼの活性阻害剤と、その剤の製造方法やその剤の利用方法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

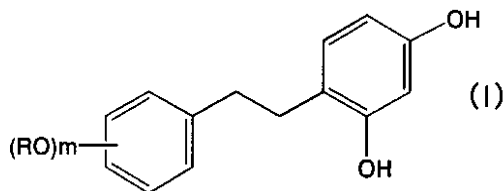
本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、ユリ科の薬用植物であるChlorophytum arundinaceumの抽出物中に存在する特定のビベンジル配糖体、及び化学合成誘導体が水溶性で強いチロシナーゼ阻害活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち本発明は、(1)以下の式(I)(式中、Rは、水素原子又はグリコシル基を表わし、mは1又は2を表し、mが2の場合、Rは、同一又は異なってもよい)で示されるビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤に関する。

20

【化1】

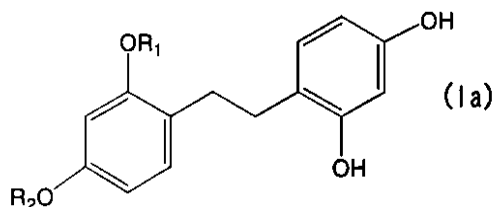


【0010】

また本発明は、(2)上記式(I)で示される化合物が、式(Ia)(式中、R₁及びR₂は、同一又は異なって、水素原子又はグリコシル基を表わす)であることを特徴とする上記(1)記載のビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤に関する。

30

【化2】



40

【0011】

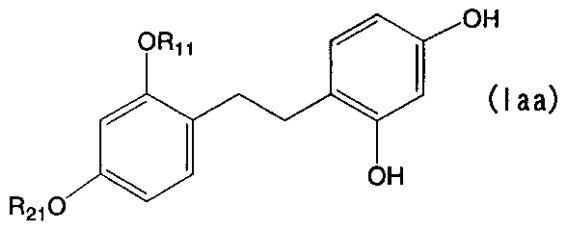
また本発明は、(3)グリコシル基が、五単糖残基であることを特徴とする上記(1)又は(2)記載のビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤や、(4)五炭糖残基が、キシロシル基であることを特徴とする上記(3)記載のビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤や、(5)R₁がキシロシル基を、R₂が水素原子であるか、R₁及びR₂が共にキシロシル基であるか、R₁が水素原子を、R₂がキシロシル基であるか、又は、R₁及びR₂が共に水素原子であることを特徴とする(2)記載のビベンジル誘導体を含むチロシナーゼの活性阻害剤に関する。

【0012】

50

また本発明は、(6)以下の式(Iaa)(式中、 R_{11} はキシロシル基を表し、 R_{12} は水素原子又はキシロシル基を表す)で表されるビベンジル誘導体に関する。

【化3】

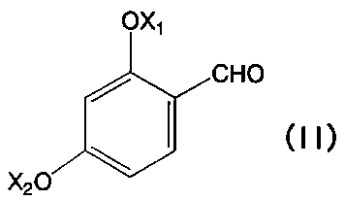


10

【0013】

さらに、本発明は、(7)2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドを出発物質として、該化合物から得られる以下の式(II)

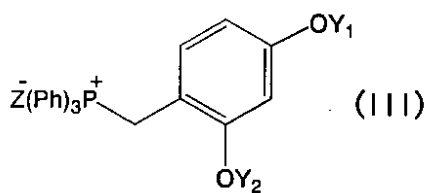
【化4】



20

(式中、 X_1 及び X_2 は、同一又は異なって、水酸基の保護基を表す)で表されるベンズアルデヒド誘導体と、同じく、2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドから得られる以下の式(III)

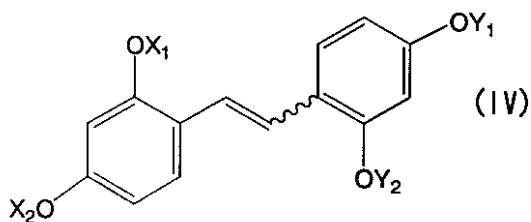
【化5】



30

(式中、 Y_1 及び Y_2 は、同一又は異なって、水酸基の保護基を表し、Zはハロゲン原子を表す)で表されるホスホニウム塩とを、ウィッティッヒ(Wittig)反応条件下に反応させ、以下の式(IV)

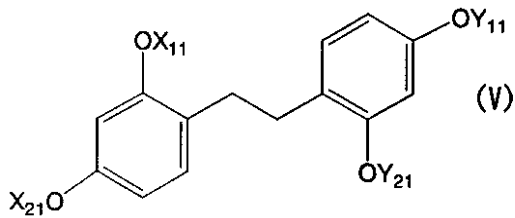
【化6】



40

(式中、 X_1 、 X_2 、 Y_1 及び Y_2 は、前記と同義である；波線はシス又はトランスを表す)で表されるスチルベン誘導体を得、次いで、式(IV)で表される化合物を水素添加反応に付すことにより、以下の式(V)

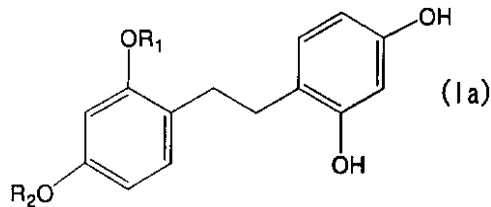
【化 7】



(式中、 X_{11} 、 X_{21} 、 Y_{11} 及び Y_{21} は、同一又は異なって、水素原子又は水酸基の保護基を表す) で表されるビベンジル誘導体を製造する工程を含む、以下の式 (I a)

10

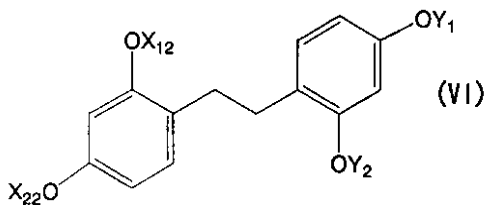
【化 8】



(式中、 R_1 及び R_2 は、同一又は異なって、水素原子又はグリコシル基を表わす) で表されるビベンジル誘導体の製造方法や、(8) 以下の式 (VI)

20

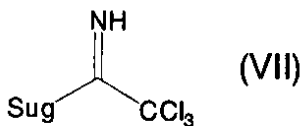
【化 9】



(式中、 X_{12} 及び X_{22} の少なくとも 1 つは水素原子を表し、他は水酸基の保護基を表し、 Y_1 及び Y_2 は、前記と同義である) で表されるビベンジル誘導体をアグリコン部分として、以下の式 (VII)

30

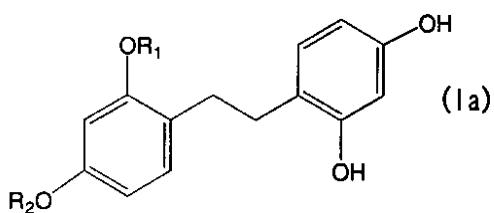
【化 10】



(式中、Sug は、糖残基の官能基が保護されたグリコシル基を表す) で表されるイミデートでグリコシル化し、次いで、保護基を脱離することからなる、以下の式 (I a)

40

【化 11】



(式中、 R_1 及び R_2 は、前記と同義である) で表されるビベンジル誘導体の製造方法に関する。

50

【0014】

本発明はまた、上記(1)～(5)のいずれか記載のチロシナーゼの活性阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする美白剤に関する。

【発明の効果】

【0015】

本発明のビベンジル誘導体を含有するチロシナーゼの活性阻害剤は、皮膚褐色化防止機能性化粧品即ち皮膚の美白化粧品や、野菜など植物カット食材の鮮度保持を目的とする褐変防止機能性添加剤や昆虫のさなぎ化抑止機能による殺虫剤としての用途が期待できる。また、本発明のビベンジル誘導体を含有するチロシナーゼの活性阻害剤の製造方法は、安価なジヒドロキシベンズアルデヒドから多くて8段階程度の短い工程で合成できるため、

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、上記式(I)で示される化合物[以下、化合物(I)という]において、置換基ORの置換数は1～2で、好ましくは2であり、その場合のORは、同一又は異なっているいてもよい。また、置換基の位置は、置換可能な何れの位置でもよく、特に制限されないが、好ましくはエチレン鎖が置換している位置からオルト又はパラ位であり、上記式(Ia)で表される化合物[以下、化合物(Ia)という]がより好ましい。

【0017】

式(I)等の各基の定義において、グリコシル基は、水溶性を示す糖残基であれば特に制限されず、単糖類又はオリゴ糖類の何れの残基でもよい。単糖類としては、三～七炭糖類の何れでもよいが、好ましくは、五炭糖類又は六炭糖類である。五炭糖類の具体例としては、リボース、キシロース、アラビノース等が挙げられ、六炭糖類の具体例としては、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース等が挙げられ、特に、五炭糖のキシロースが好ましい。オリゴ糖類としては、二～六糖類が好ましく、特に、二糖類が好ましい。二糖類の具体例としては、スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、トレハロース等が挙げられる。その他、三糖類としては、ラフィノース、パノース、メレジトース、ゲンチアノース等が、四糖類としては、スタキオース等が挙げられる。その他のグリコシル基としては、デオキシリボース、フコース、ラムノース等のデオキシ糖、グルクロン酸等のウロン酸、グルコサミン等のアミノ糖の各残基も挙げられる。また、これら糖類は、D-体、L-体又はこれらの混合物等、何れの異性体も、使用することができる。

20

30

【0018】

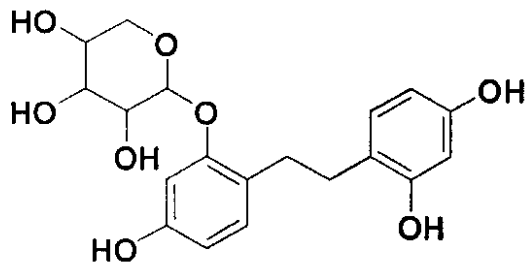
水酸基の保護基及び糖の官能基の保護基としては、通常の有機合成化学で常用されている保護基を使用することができ、例えば、塩基性条件化に脱保護できる、アセチル基、ベンゾイル基などのアシル基等、酸性条件下で脱保護できる、メトキシメチル基、テトラヒドロフラン基などのエーテル類等、加水素分解により脱保護できるベンジル基などがあげられる。また、目的化合物により、特定の位置の保護基を選択的に脱保護することを所望の場合は、前記保護基を適宜組み合わせ用いればよい。また、ハロゲン原子としては、塩素、臭素、ヨウ素等を例示することができる。

40

【0019】

本発明のチロシナーゼの活性阻害剤として好ましく使用することができる具体的化合物としては、前記式(Ia)中、 R_1 がキシロシル基を表わし、 R_2 が水素原子を表わす下記式で示される化合物(以下「化合物(1)」という)が例示される。

【化 1 2】



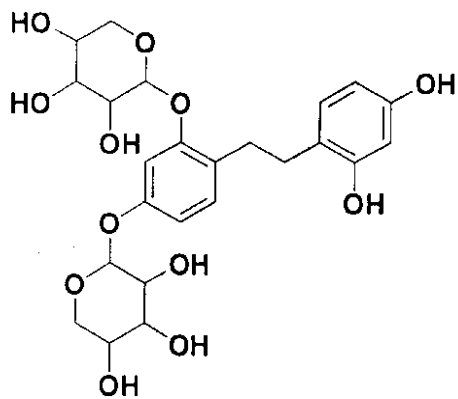
10

【 0 0 2 0】

また、式 (I a) 中、 R_1 及び R_2 が、共にキシロシル基を表わす下記式で示される化合物 (以下、「化合物 (2) 」という) が例示される

【 0 0 2 1】

【化 1 3】



20

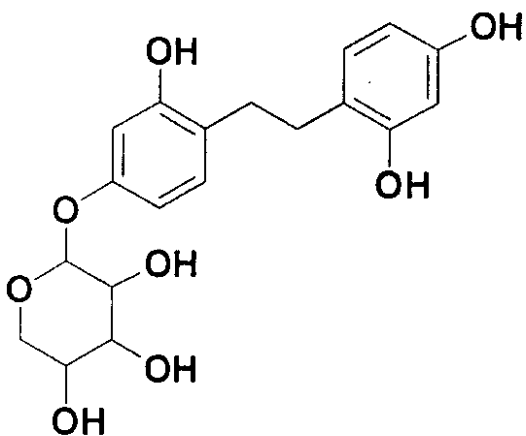
【 0 0 2 2】

また、式 (I a) 中、 R_1 が水素原子を表わし、 R_2 がキシロシル基を表わす下記式で示される化合物 (以下、「化合物 (3) 」という) が例示される。

30

【 0 0 2 3】

【化 1 4】



40

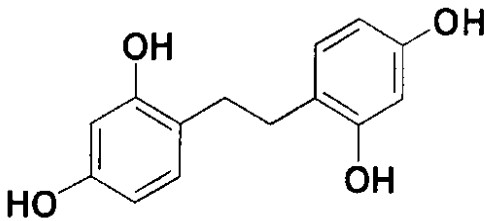
【 0 0 2 4】

50

さらに、式 (I a) 中、 R_1 及び R_2 が、共に水素原子を表わす下記式で示される化合物 (以下、「化合物 (4)」という) が例示される。

【0025】

【化15】



10

【0026】

特に、化合物 (2) と化合物 (3) は、天然には存在しない新規化合物であり、その合成が本願製造方法で初めて可能になった。

上記化合物 (1) ~ (4) など、化合物 (I) は、いずれもレゾルシノール誘導体と結合したビベンジル誘導体であり、レゾルシノール誘導体である従来のヘキシルレゾルシノール誘導体とはビベンジル誘導体部分が全く異なった分子構成となっている。

酸化還元酵素のチロシナーゼに対して、化学結合しやすい化学構成となっており、チロシナーゼの分子がレゾルシノール誘導体に一部置換されて別物質になり、フェノール類の着色・ポリマー化の際の酸化還元酵素としての機能が失われるため、フェノール類の着色・ポリマー化を阻害する機能を有する化合物、即ちチロシナーゼの活性阻害剤となる。

20

【0027】

化合物 (1) は、古代の医術書であるアールヴェーダに薬用植物として記載され強壯剤として現在も利用されているインド産のユリ科植物 *Chlorophytum arundinaceum* に含まれている。この物質は 1993 年、Tandon らがこの植物から 2', 4, 4' - トリヒドロキシ - 2 - D - キシロピラノシルビベンジルを単離し構造決定した。しかし、その全合成は達成されておらず、生理活性についても未だ明らかにされていない。

【0028】

本発明では、そのレゾルシノールと糖構造の両方を有するビベンジル配糖体に着目し、その物質の全合成を可能にした。

30

さらにレゾルシノール誘導体を持つビベンジル誘導体の化合物の化学合成に成功し、製造した各物質のチロシナーゼ阻害活性の効果を確認した。

【0029】

次に本発明のビベンジル誘導体の製造方法について、グリコシル基としてキシロシル基を用いた場合 [化合物 (1) ~ (3)] 及び化合物 (4) を例として、以下詳しく説明する。

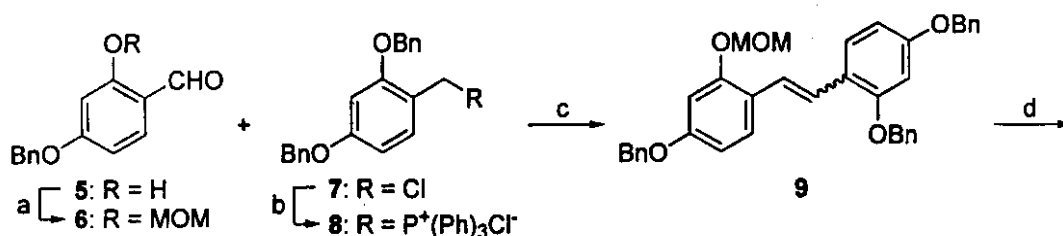
【0030】

製造法 A . 化合物 (1) の製造方法

化合物 (1) は、下記 [化16] 及び [化17] に示す反応工程に従い製造することができる。

40

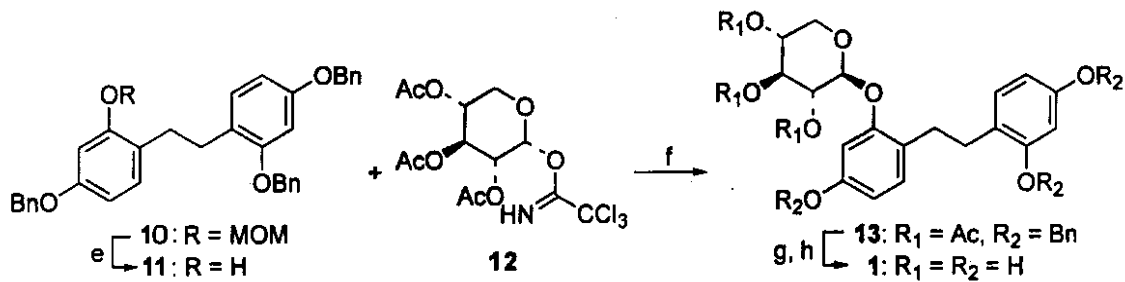
【化16】



50

【 0 0 3 1 】

【 化 1 7 】



10

【 0 0 3 2 】

[化合物 (5) の 合 成]

2, 4 - ジヒドロキシベンズアルデヒドの溶媒中、ベンジルブロミド (B n B r)、塩基、触媒量のテトラブチルアンモニウムヨード (T B A I) を加えて反応し、4位の水酸基を選択的にベンジル (B n) 化し、4 - ベンジルオキシサリチルアルデヒド (5) を得る。

この反応の際、塩基としては、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、フッ化カリウムなどが用いられ、また、溶媒はアセトニトリル、アセトンなどが用いられる。

【 0 0 3 3 】

(工 程 a)

アルデヒド (5) の溶液に、クロロメチルメチルエーテル (M O M C 1) と塩基、触媒量の T B A I を加えて反応し、2位の水酸基をメトキシメチル (M O M) 化し、2 - メトキシメチル - 4 - ベンジルオキシベンズアルデヒド (6) を得る。

この反応の際、塩基としては、N, N - ジイソプロピルエチルアミン (D I P E A)、トリエチルアミン (T E A)、炭酸カリウムなどが用いられ、溶媒は、ジクロロメタン、四塩化炭素、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、テトラヒドロフラン (T H F) 等のエーテル類、N, N - ジメチルホルムアミド (D M F) などが用いられる。

【 0 0 3 4 】

[化合物 (7) の 合 成]

2, 4 - ジヒドロキシベンズアルデヒドを溶媒に溶解し、B n B r、塩基を加え反応し、水酸基をベンジル化し、2, 4 - ジベンジルオキシベンズアルデヒドを得る。この反応の際の塩基は炭酸カリウム、水素化ナトリウム、炭酸ナトリウムなどが用いられ、溶媒は、D M F、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド (D M S O)、アセトン、T H F などが用いられ、使用する塩基に応じて選択すればよい。次いで、得られたジベンジル体を溶媒に溶解し、還元剤を加えてアルデヒド基を還元し、2, 4 - ジベンジルオキシベンジルアルコールを得る。この反応の際の還元剤は、水素化ホウ素ナトリウム、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素リチウムなどが用いられる。溶媒はメタノール (M e O H)、エタノール、プロパノール、イソプロパノールなどのアルコール類単独や、それらとジエチルエーテル、ベンゼン、トルエン等との混合溶媒が用いられ、使用する還元剤に応じて選択すればよい。その後、このベンジルアルコール体のベンジル位をクロロ化することによりクロロ体 (7) を得る。この反応の際、クロロ化試薬としては、例えば、塩化チオニル、三塩化リン、オキサリルクロリドなどが用いられ、また、化合物 (7) は、三臭化リンなどのプロモ化試薬によるプロモ化することによりプロモ体としても、以降の反応に使用することができる。溶媒は、トルエン、ベンゼンなどの芳香族炭化水素類、四塩化炭素などのハロゲン化炭化水素類が用いられる。

30

40

【 0 0 3 5 】

(工 程 b)

クロロ体 (7) に溶媒とトリフェニルホスフィンを加えて反応し、ホスホニウム塩 (8) を得る。

この反応の際の溶媒は、トルエン、ベンゼンなどの芳香族炭化水素類や四塩化炭素など

50

のハロゲン化炭化水素類が用いられる。

【0036】

(工程c)

工程aで得られるアルデヒド(6)と工程bで得られるホスホニウム塩(8)を用いてウィッティヒ(Wittig)反応を行い、スチルベン(9)を得る。

この反応の際、塩基としては、例えば、リチウムビス(トリメチルシリル)アミド、ナトリウムビス(トリメチルシリル)アミド、カリウムビス(トリメチルシリル)アミド、*n*-ブチルリチウム、*tert*-ブトキシカリウム、水素化ナトリウム、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデク-7-エン(DBU)などが用いられる。また、溶媒としては、例えば、THF、アセトニトリル、ジエチルエーテル、DMFなどが用いられる。

【0037】

(工程d)

スチルベン(9)を用いて、溶媒中、パラジウム-活性炭素エチレンジアミン複合体を加えて水素添加反応を行い、スチルベンの二重結合を選択的に還元し、ビベンジル(10)を得る。この反応の際、溶媒としては、例えば、THF、ジエチルエーテルなどのエーテル類、MeOH、エタノールなどのアルコール類が用いられる。

【0038】

(工程e)

ビベンジル(10)の2位のメトキシメチル基を脱保護するため、酸処理することにより、ビベンジル(11)を得る。この反応の際、酸としては、*p*-トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、ピリジニウム*p*-トルエンスルホナート、塩酸、硫酸、トリフルオロ酢酸などが用いられる。また、溶媒としては、MeOH、エタノール、プロパノール、イソプロパノールなどのアルコール類が単独に、あるいは、それらとジエチルエーテル、THFなどのエーテル類、ベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素類との混合溶媒として用いられる。

【0039】

[化合物(12)の合成]

キシロースをピリジンなどの溶媒に溶解し、無水酢酸及びTEAなどの塩基を加え反応し、1,2,3,4-テトラアセチルキシロースを得る。

次いで、得られたテトラアセチル体の溶液に、塩基を加えて反応し、1位のアセチル基を選択的に脱保護して、2,3,4-トリアセチルキシロースを得る。

この際、塩基としては、例えば、ピペリジン、ベンジルアミン、ヒドラジンアセテートなどが用いられ、溶媒としては、DMF、アセトニトリルなどを使用する塩基に応じて選択すればよい。さらに、このトリアセチル体の溶液に、トリクロロアセトニトリルと触媒量のDBUを加え反応し、イミデート(12)を得る。この反応では、溶媒としては、ジクロロメタン、四塩化炭素などのハロゲン化炭化水素類、ベンゼンなどが用いられる。

【0040】

(工程f)

得られたイミデート(12)を用いて、工程eで合成したアグリコン(11)のグリコシル化を行う。反応は、ルイス酸存在下にカップリング反応を行い、ベンジル(13)を得る。この反応では、ルイス酸として、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル(TMSOTf)、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル複合体、塩化スズ、塩化鉄、塩化アルミニウム、塩化チタンなどが用いられる。また、溶媒としては、ジクロロメタン、四塩化炭素などのハロゲン化炭化水素類、ベンゼンなどが用いられる。

【0041】

(工程g)

ビベンジル(13)を溶媒中、触媒の存在下に加水素分解を行い、ベンジル基を脱保護し、脱ベンジル体を得る。この反応では、加水分解触媒として、例えば、水酸化パラジウム-炭素、パラジウム-炭素、酸化白金などが用いられ、溶媒としては、酢酸エチル、THF、MeOH、エタノールなどが単独あるいは混合して用いられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

(工程 h)

工程 g で得られる脱ベンジル体を溶媒中、塩基の存在下に反応し、アセチル基の脱保護を行い、目的とするピベンジル配糖体 (1) を得る。この反応では、塩基として、例えば、ナトリウムメトキシド (NaOMe)、炭酸カリウム、炭酸ナトリウムなども用いられ、溶媒も使用する塩基にあわせて、MeOH、エタノール、THFなどが、単独又は混合して用いられる。

【 0 0 4 3 】

なお、これら各工程における反応温度は、 -78 から使用する溶媒の沸点の間で、また、反応時間は、5分から48時間の間で行われ、使用する溶媒、触媒及び塩基等により適宜選択すればよい。

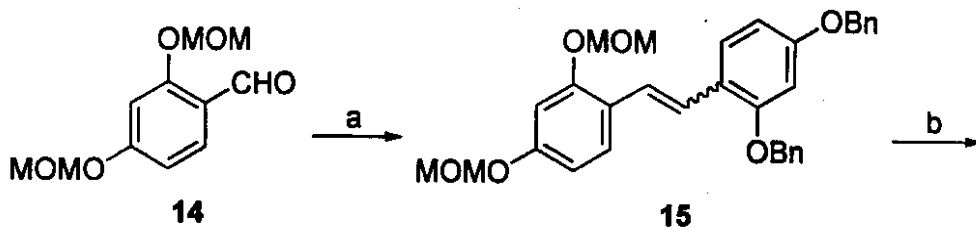
10

【 0 0 4 4 】

製造法 B . 化合物 (2) の製造方法

化合物 (2) は、下記 [化 1 8] 及び [化 1 9] に示す反応工程に従い製造することができる。

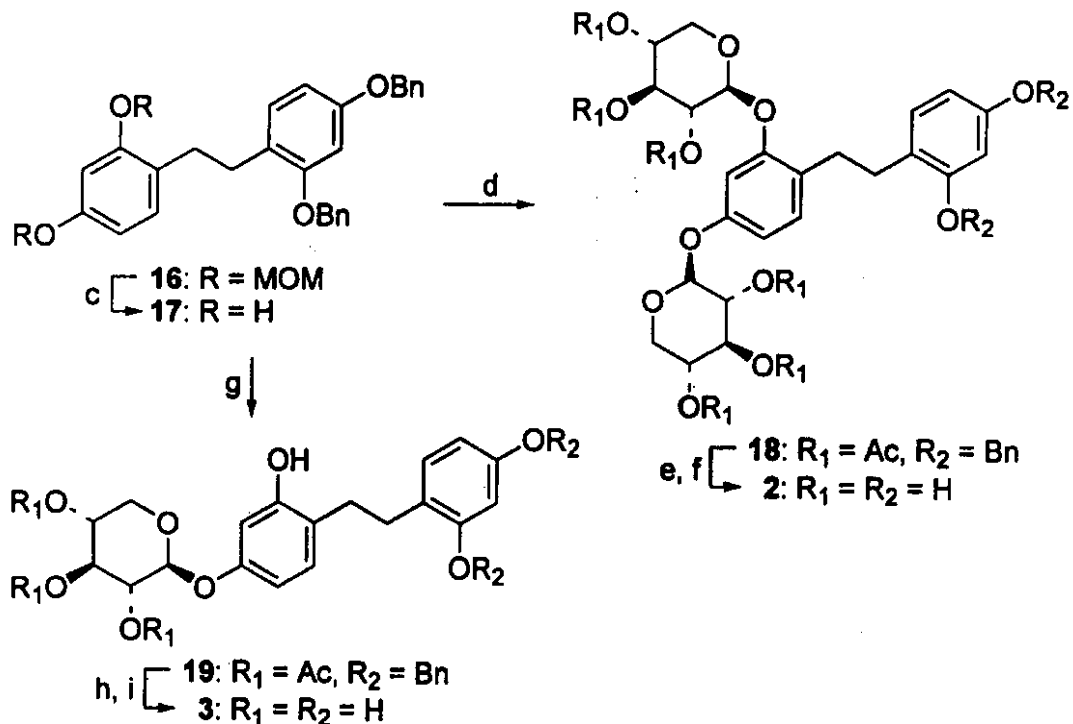
【 化 1 8 】



20

【 0 0 4 5 】

【 化 1 9 】



30

40

【 0 0 4 6 】

[化合物 (1 4) の合成]

2, 4 - ジヒドロキシベンズアルデヒドの溶液に、MOMC 1 と塩基を加えて反応し、

50

2 位及び 4 位の水酸基をメトキシメチル化し、アルデヒド (1 4) を得る。

この反応において使用する塩基は、例えば、T E A、D I P E A、炭酸カリウムなどが用いられ、溶媒は塩基の種類に応じて、T H F、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、D M Fなどが用いられる。反応時間は、- 7 8 から使用する溶媒の沸点の間で、また、反応時間は、5 分から 4 8 時間の間で行われ、使用する溶媒及び塩基等により適宜選択すればよい。

【 0 0 4 7 】

(工程 a)

アルデヒド (1 4) と製造法 A、工程 b で得られるホスホニウム塩 (8) を用いてウィッティッヒ反応を行い、スチルベン (1 5) を得る。反応は、製造法 A、工程 c 記載の方法に準じて行うことができる。

10

(工程 b)

スチルベン (1 5) は、水素添加反応を行い、スチルベンの二重結合を選択的に還元し、ビベンジル (1 6) を得る。反応は、製造法 A、工程 d 記載の方法に準じて行うことができる。

(工程 c)

ビベンジル (1 6) の 2 位、4 位のメトキシメチル基を脱保護し、ビベンジル (1 7) を得る。反応は、製造法 A、工程 e 記載の方法に準じて行うことができる。

(工程 d)

製造法 A で得られるイミデート (1 2) の過剰量を用いて、アグリコン (1 7) のグリコシル化を行い、ビベンジル (1 8) を得る。反応は、製造法 A、工程 f 記載の方法に準じて行うことができる。

20

(工程 e)

ビベンジル (1 8) は、製造法 A、工程 g 記載の方法に準じて、ベンジル基の脱保護を行うことができる。

(工程 f)

次いで、製造法 A、工程 h 記載の方法に準じて、アセチル基の脱保護を行うことにより、目的とするビベンジル配糖体 (2) を得る。

【 0 0 4 8 】

製造法 C . 化合物 (3) の製造方法

30

化合物 (3) は、上記 [化 1 9] に示す反応工程に従い製造することができる。

(工程 g)

製造法 B、工程 c で得られるアグリコン (1 7) に、製造法 A で得られるイミデート (1 2) の 1 当量を加えて、ルイス酸存在下にカップリング反応を行い、4 位がキシロシル化したビベンジル (1 9) を得る。反応は、製造法 A、工程 f 記載の方法に準じて行うことができる。

(工程 h)

ビベンジル (1 9) は、製造法 A、工程 g 記載の方法に準じて、ベンジル基の脱保護を行うことができる。

(工程 i)

40

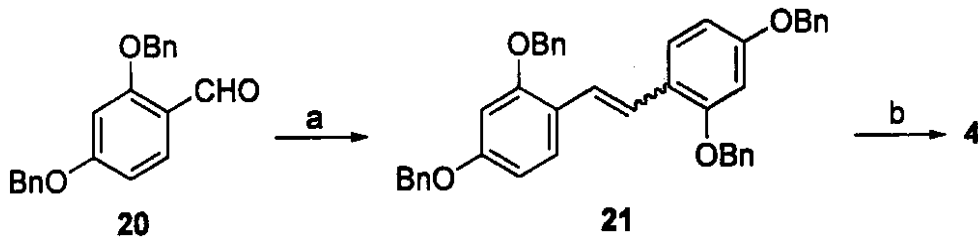
次いで、製造法 A、工程 h 記載の方法に準じて、アセチル基の脱保護を行うことにより、目的とするビベンジル配糖体 (3) を得る。

【 0 0 4 9 】

製造法 D . 化合物 (4) の製造方法

化合物 (4) は、下記 [化 2 0] に示す反応工程に従い製造することができる。

【化 2 0】



【0050】

(工程 a)

10

2, 4 - ジヒドロキシベンズアルデヒドから、製造法 A、化合物 (7) の製法と同様の方法で得られる 2, 4 - ジベンジルオキシベンズアルデヒド (20) と製造法 A、工程 b で得られるホスホニウム塩 (8) を用いて、製造法 A、工程 c の方法に準じてスチルベン (21) を得る。

(工程 b)

スチルベン (21) は、触媒の存在下に水素添加反応を行うことにより、二重結合の還元及びベンジル基の脱保護を同時に行い、目的とするビベンジル誘導体 (4) を得る。

この反応では、触媒として、例えば、水酸化パラジウム-活性炭素、パラジウム-炭素、酸化白金などが用いられ、溶媒としては、酢酸エチル、THF、MeOH、エタノールなどが、単独又は混合して用いられる。反応時間は、- 78 から使用する溶媒の沸点の間で、また、反応時間は、5分から48時間の間で行われ、使用する溶媒及び塩基等により適宜選択すればよい。

20

【0051】

上記各製造法における中間体および目的化合物は、有機合成化学で常用される精製法、例えば、中和、濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、再結晶、各種クロマトグラフィー等にして単離精製することができる。また、中間体においては、特に精製することなく次の反応に供することも可能である。

【0052】

なお、化合物 (I) において、グリコシル基がキシロシル基以外の基を有する化合物についても、糖類等の有機合成化学で常用される保護基の導入及び脱離等の方法、また、置換基の位置についても、所望の位置に水酸基を有する原料を用いる等の手段により、上記製造法で詳述したキシロシル基についての製造法に準じて製造することができる。化合物 (I) は、水又は各種溶媒との付加物として存在し、単離精製される場合もあるが、これら付加物も本発明の阻害剤として使用することができる。また、化合物 (I) は、光学異性体等、各種異性体が存在するが、これら全ての可能な異性体及びそれらの混合物も本発明の阻害剤として使用することができる。

30

【0053】

また、上記化合物 (1) ~ (4) における親水性をコンピュータで計算した結果を下記に示す。

(化合物)	(Log P)
1	1.68
2	0.38
3	1.68
4	2.99

40

この表の Log P の値は、小さいほど親水性が高く、水に溶けやすいことを示している。

ビベンジル誘導体のうち、化合物 (1) ~ (3) には糖類のキシロースを含むので毒性が少なく、安全性が高いので食品など多様な用途に使用可能となる。

【0054】

上記データから明らかなように、本発明の阻害剤として使用される化合物は、水溶性に

50

優れており、また、チロシナーゼの活性に対してコウジ酸の5倍～20倍にもなる極めて高い阻害効果が得られる（実施例5参照）。

一般に、ビベンジル誘導体に糖類のキシロースを含む場合は毒性が少なくなることが知られているので、人体や食品等に用途が広がる可能性がある。

【0055】

化合物(I)を本発明のチロシナーゼの活性阻害剤として使用する場合、そのまま単独で使用することも可能であるが、通常、各種用途に応じた使用形態とすることが望ましく、活性成分である化合物(I)と医薬品、化粧品などに一般に用いられる各種成分、例えば、水性成分、油性成分、粉末成分、界面活性剤、保湿剤、増粘剤、色剤、香料、pH調整剤、抗酸化剤、防腐剤、あるいは紫外線防御剤などを1種又は2種以上を本発明の効果を損なわない範囲で配合することができる。

10

【0056】

例えば、化合物(I)や化合物(I)を含有する本発明のチロシナーゼの活性阻害剤を、水やペースト基材と混合して塗布用の異皮膚褐色化防止機能性化粧品、即ち皮膚の美白化粧品（美白効果の高い皮膚外用剤や美白用皮膚外用剤）として使用でき、また、化合物(I)や化合物(I)を含有する本発明のチロシナーゼの活性阻害剤を、水と混合して植物カット食材の褐変防止機能性添加剤や散布剤として使用すれば野菜野鮮度保持に効果が得られ、さらに昆虫のさなぎ化抑止剤、殺虫剤として人畜無害な薬剤として安全に使用することが可能となる。化合物(I)や本発明のチロシナーゼの活性阻害剤はメラニン生成を抑制することから、美白剤として有用であり、皮膚外用剤に好適に配合される。そして、本発明のピペロナルドキシムとその類似体は細胞毒性が非常に低いため、配合量を高く設定することができる。本発明の美白剤を皮膚外用剤として用いる場合、通常化粧品や医薬品等の皮膚外用剤に用いられる他の成分、例えば、粉末成分、液体油脂、固体油脂、高級脂肪酸、高級アルコール、低級アルコール、多価アルコール、エステル類、シリコーン、各種界面活性剤、保湿剤、水溶性高分子化合物、増粘剤、紫外線吸収剤、金属イオン封鎖剤、糖類、アミノ酸類、有機アミン類、pH調整剤、皮膚栄養剤、ビタミン類、酸化防止剤、酸化防止助剤、香料、水等を必要に応じて適宜配合することができる。さらに、ビタミンC、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の他の美白剤も適宜配合することができる。

20

【0057】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

30

【実施例1】

【0058】

2',4,4'-トリヒドロキシ-2'-D-キシロピラノシルビベンジル[化合物(1)]の合成

i) ホスホニウム塩(8)の合成

出発物資である2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドをDMFに溶解し、ベンジルプロマイド及び炭酸カリウムを加え、60℃で一晩攪拌して水酸基をベンジル化した。

結果、収率99%で2,4-ジベンジルオキシベンズアルデヒドを得た。

40

これを、ジエチルエーテルとMeOHの混合溶媒に溶解し、氷冷下で水素化ホウ素ナトリウムを加えてアルデヒド基を還元し、2,4-ジベンジルオキシベンジルアルコールを収率98%で得た。その後、このトルエン溶液に塩化チオニルを加えてベンジル位をクロロ化し、クロロ体(7)とした。反応液中の過剰の塩化チオニル及び酸を減圧下で完全に除去した後、トルエンとトリフェニルホスフィンを加えて30分間リフラックスし、ホスホニウム塩(8)を収率59%で得た。

【0059】

ii) アグリコン(11)の合成

2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドのアセトニトリル溶液に、ベンジルプロミド、炭酸水素ナトリウム、触媒量のテトラブチルアンモニウムヨードを加え、16時間リフ

50

ラックスし、78%の収率で4-ベンジルオキシサリチルアルデヒド(5)を得た。

アルデヒド(5)のジクロロメタン溶液に、MOMC1とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)、触媒量のTBAIを加えて一晩攪拌し、2位の水酸基をMOM化し、2-メトキシメチル-4-ベンジルオキシベンズアルデヒド(6)を収率100%で得た。

このアルデヒド(6)とホスホニウム塩(8)のTHF溶液に、氷冷下でリチウムビス(トリメチルシリル)アミドを加え、室温で12時間、ウィッティッヒ反応を行い、収率90%でスチルベン(9)を得た。ウィッティッヒ反応におけるシスとトランスの比率は¹H-NMR解析により3:2であった。スチルベン(9)は酸性条件下で不安定であったため、THF中、パラジウム-活性炭素エチレンジアミン複合体を加えて水素添加反応を行い、スチルベンの二重結合を選択的に還元し、ピベンジル(10)を収率86%で得た。

さらに、ピベンジル(10)の2位のMOM基を脱保護するため、THF/MeOH溶液中に、p-トルエンスルホン酸を加えて2時間リフラックスし、収率89%でピベンジル(11)を得た。

【0060】

iii) ピベンジル配糖体(1)の合成

ピリジンにD-(+)-キシロースを溶解し、無水酢酸、TEAを加え、一晩攪拌してテトラアセチルキシロースを収率75%で得た。次に、このTHF溶液に、ペペリジンを加えて一晩攪拌し、1位のアセチル基を選択的に脱保護して、収率53%で2,3,4-トリアセチルキシロースを得た。さらに、このジクロロメタン溶液に氷冷下でトリクロロアセトニトリルと触媒量のDBUを加え、室温で2時間攪拌し、収率72%でイミデート(12)を得た。最後に、得られたイミデート(12)を用いて合成したアグリコン(11)のグリコシル化を行った。イミデート(12)とアグリコン(11)のジクロロメタン中、氷冷下でルイス酸であるトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル(TMSOTf)を加え、5分間、カップリング反応を行った結果、収率100%でピベンジル(13)を得た。ピベンジル(13)を酢酸エチル/MeOH中、水酸化パラジウムを触媒として加水素分解を行い、ベンジル基を脱保護し(収率100%)、さらにMeOH溶液中に、氷冷下で、NaOMeを滴下し、約30分間攪拌して、アセチル基の脱保護を行った。反応液は、酸処理した後に、分取HPLCによって目的物質であるピベンジル配糖体(1)を単離し、¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT、HMQC及びHMBICにより、天然物と同一の構造であることを確認した。合成の総収率は51%であった。

【0061】

2',4,4'-トリヒドロキシ-2-D-キシロピラノシルピベンジル化合物[化合物(1)]

¹H-NMR(400MHz,CD₃OD) 6.89(d,J=8.3Hz,1H),6.83(d,J=8.3Hz,1H),6.36(dd,J=2.4,8.3Hz,1H),6.27(d,J=2.4Hz,1H),6.19(dd,J=2.4,8.3Hz,1H),4.79(d,J=7.3Hz,1H),3.94(dd,J=5.4,11.2Hz,1H),3.60(dt,J=5.4,8.8Hz,1H),3.52(dd,J=7.3,8.8Hz,1H),3.43(t,J=8.8Hz,1H),3.36(m,1H),2.70(m,4H)。

¹³C-NMR(400MHz,CD₃OD) 157.5(s),157.3(s),156.7(s),131.8(d),131.5(d),124.2(s),121.4(s),110.0(d),107.5(d),104.0(d),103.5(d),103.4(d),77.7(d),74.9(d),71.1(d),66.9(t),32.1(t),31.9(t)。

【実施例2】

【0062】

2',4'-ジヒドロキシ-2,4-D-キシロピラノシルピベンジル[化合物(2)]の合成

2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドのテトラヒドフラン溶液に、氷冷下でMOM1とTEAを加えて1時間攪拌し、2位,4位の水酸基をMOM化し、アルデヒド(14)

を収率 100% で得た。アルデヒド (14) とホスホニウム塩 (8) の THF 溶液に、氷冷下でリチウムビス(トリメチルシリル)アミドを加え、室温で 1.5 時間、ウィッティッヒ反応を行い、収率 84% でスチルベン (15) を得た。ウィッティッヒ反応におけるシスとトランスの比率は ^1H -NMR 解析により 3:1 であった。スチルベン (15) は酸性条件下で不安定であったため、THF 中、パラジウム-活性炭素エチレンジアミン複合体を加えて水素添加反応を行い、スチルベンの二重結合を選択的に還元し、ビベンジル (16) を収率 72% で得た。さらに、ビベンジル (16) の 2 位、4 位の MOM 基を脱保護するため、THF/MeOH 溶液中に、p-トルエンスルホン酸を加えて 30 分間リフラスし、収率 100% でビベンジル (17) を得た。過剰量のイミデート (12) とアグリコン (17) のジクロロメタン溶液中、氷冷下でルイス酸であるトリフルオロメ

10

【0063】

2',4'-ジヒドロキシ-2,4-D-キシロピラノシルビベンジル [化合物 (2)]

20

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) 6.99 (d, $J=8.3\text{ Hz}$, 1H), 6.84 (d, $J=2.4\text{ Hz}$, 1H), 6.81 (d, $J=8.3\text{ Hz}$, 1H), 6.64 (dd, $J=2.4, 8.3\text{ Hz}$, 1H), 6.27 (d, $J=2.4\text{ Hz}$, 1H), 6.18 (dd, $J=2.4, 8.3\text{ Hz}$, 1H), 4.81 (d, $J=7.4\text{ Hz}$, 1H), 4.78 (m, 1H), 3.94 (dd, $J=5.4, 11.2\text{ Hz}$, 1H), 3.92 (dd, $J=5.4, 11.2\text{ Hz}$, 1H), 3.60 (td, $J=5.4, 8.8, 9.8\text{ Hz}$, 1H), 3.55 (td, $J=5.4, 8.7, 9.8\text{ Hz}$, 1H), 3.52 (dd, $J=7.4, 8.8\text{ Hz}$, 1H), 3.43 (t, $J=8.8\text{ Hz}$, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.33 (m, 1H), 2.74 (m, 4H).

^{13}C -NMR (400 MHz, CD_3OD) 158.1 (s), 157.4 (s, 2C), 156.7 (s), 131.8 (d), 131.4 (d), 127.4 (s), 121.1 (s), 111.1 (d), 107.5 (d), 105.9 (d), 103.5 (d), 103.4 (d), 103.3 (d), 77.7 (d, 2C), 74.9 (t), 74.7 (t), 71.0 (d, 2C), 67.0 (d), 66.9 (d), 31.9 (t, 2C).

30

【実施例 3】

【0064】

2,2',4'-トリヒドロキシ-4-D-キシロピラノシルビベンジル [化合物 (3)] の合成

アグリコン (17) と 1 当量のイミデート (12) をジクロロメタン溶液に加えて、氷冷下にルイス酸としてのトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル存在下に、5 分間カップリング反応を行った結果、4 位がキシロシル化したビベンジル (19) を 71% の収率で得た。得られたビベンジル (19) を酢酸エチル/MeOH 中、水酸化パラジウム-炭素を触媒として、室温で 1 時間加水素分解を行い、ベンジル基を脱保護し (収率 96%)、さらに MeOH 溶液中に、氷冷下で NaOMe を滴下し、約 30 分間攪拌して、アセチル基の脱保護を行った。反応液は、酸処理した後に、分取 HPLC によって目的物質であるビベンジル配糖体 3 を単離し、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT、HMQC 及び HMBIC により、構造を確認した。

40

【0065】

2,2',4'-トリヒドロキシ-4-D-キシロピラノシルビベンジル [化合物 (3)]

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) 6.88 (d, $J=8.3\text{ Hz}$, 1H), 6.76 (d, $J=8.3\text{ Hz}$, 1H), 6.52 (d, $J=2.4\text{ Hz}$, 1H), 6.42 (dd, $J=2.4, 8.3\text{ Hz}$, 1H), 6.26 (d, $J=2.4\text{ Hz}$, 1

50

H) , 6.16 (dd , J = 2.4 , 8.3 Hz , 1 H) , 4.76 (d , J = 2.4 , 5.2 Hz , 1 H) , 3.89 (dd , J = 5.4 , 11.7 Hz , 1 H) , 3.53 (m , 1 H) , 3.38 (m , 2 H) , 3.33 (m , 1 H) , 2.69 (m , 4 H) .
¹³C-NMR (400 MHz , C D ₃ O D) 156.5 (s) , 155.8 (s) , 155.5 (s) , 155.4 (s) , 130.0 (d) , 129.9 (d) , 122.9 (s) , 119.7 (s) , 107.0 (d) , 105.7 (d) , 103.4 (d) , 101.9 (d) , 101.6 (d) , 76.3 (d) , 73.3 (d) , 69.6 (d) , 65.4 (t) , 31.4 (t) , 31.3 (t) .

【実施例 4】

【0066】

2, 2', 4, 4' - テトラヒドロキシスチルベン [化合物 (4)] の合成

2, 4 - ジベンジルオキシベンズアルデヒド (20) とホスホニウム塩 (8) とを THF 中、LiHMDS 存在下で、室温で 1 時間、ウィッテイッヒ反応を行い、スチルベン (21) を 42% の収率で得た。このスチルベンは不安定であったため、速やかに次の反応を行った。スチルベン (21) を THF 溶媒中、20% 水酸化パラジウム - 活性炭素を触媒として、室温で 12 時間、水素添加反応を行うことにより、二重結合の還元及びベンジル基の脱保護を同時に行い、85% の収率で白色結晶のビベンジル誘導体 (4) を得た。総収率は、36% であった。得られた化合物 (4) の構造は、¹H - NMR 及び ¹³C - NMR により決定した。

10

【0067】

2, 2', 4, 4' - テトラヒドロキシスチルベン [化合物 (4)]

¹H-NMR (400 MHz , C D ₃ O D) 6.75 (d , J = 7.8 , 1 H) , 6.23 (d , J = 2.4 , 1 H) , 6.14 (dd , J = 2.4 , 7.8) , 2.63 (s , 2 H) .
¹³C-NMR (400 MHz , C D ₃ O D) 157.4 (s) , 157.1 (s) , 131.6 (d) , 121.6 (s) , 107.5 (d) , 103.6 (d) , 31.6 (t) .

20

【実施例 5】

【0068】

チロシナーゼの活性阻害効果

DOPA 49 mg を 50 ml の精製水に溶解し、5 mM の DOPA 水溶液を調製した。

合成したビベンジル誘導体 (1) ~ (4) とコウジ酸 (対照化合物) は、それぞれ DMSO に溶解し、5 mM のサンプル溶液を調製した。

チロシナーゼを 50 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、0.67 mg / ml の酵素溶液を調製した。サンプル溶液を DMSO で希釈し、その 0.1 ml を 3 ml 容のキュベットに量り取った。次にキュベットに、250 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.6 ml、DOPA 溶液 0.3 ml、精製水 1.9 ml および酵素溶液 0.1 ml を加えてすばやく混合し、分光光度計で 475 nm の吸光値の変化を計測した。各測定は、30 分で 60 秒間行い、1 秒ごとの吸光値をコンピュータに保存した。得られた吸光値を直線回帰し、ブランク測定時の傾きを 100% として 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。この実験は各サンプルに付き 3 回行った。結果を [表 1] に示す。

30

【0069】

【表 1】

Compounds tested	IC ₅₀ (μM)
1	1.6 ± 0.43
2	0.73 ± 0.11
3	0.43 ± 0.18
4	0.37 ± 0.06
Kojic acid	7.4 ± 1.4

10

【0070】

また、試験化合物(1)~(4)及びコウジ酸の濃度変化による阻害活性との関係について、[図1]~[図4]及び[図6]に示す。また、上記各化合物のデータを比較するために棒グラフに表したのが[図5]である。

上記[表1]のIC₅₀に示されるデータは、50%阻害する各誘導体の濃度を示し、値が低いほどチロシナーゼに対する阻害活性が強いことを示している。また、±以下の数値は実験3回による標準誤差を示している。

20

【0071】

この実験データから、従来、国内で化粧品や食品にチロシナーゼ阻害剤として用いられてきたコウジ酸と比較すると、本発明のチロシナーゼ阻害剤として使用される化合物(1)では約5倍、化合物(2)は約10倍、化合物(3)及び(4)では約20倍と、いずれも非常に強いチロシナーゼ阻害活性を示していることが確認できる。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】本発明の化合物1のグラフ図である。

30

【図2】本発明の化合物2のグラフ図である。

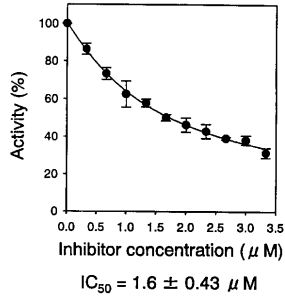
【図3】本発明の化合物3のグラフ図である。

【図4】本発明の化合物4のグラフ図である。

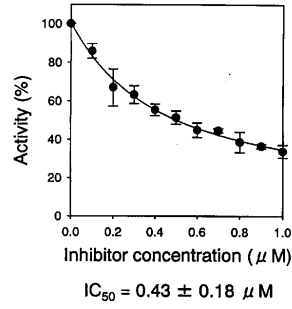
【図5】各化合物を比較した棒グラフ図である。

【図6】従来のコウジ酸のグラフ図である。

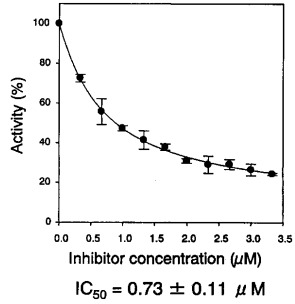
【 図 1 】



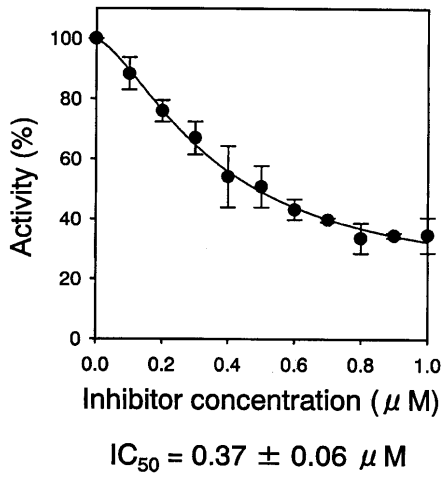
【 図 3 】



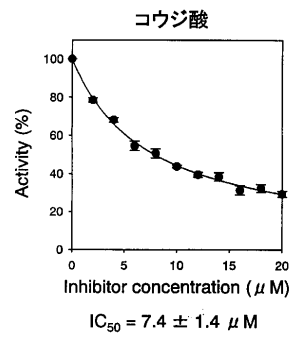
【 図 2 】



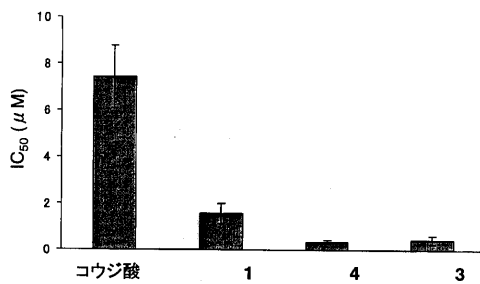
【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	8/60 (2006.01)	A 6 1 K	8/60
A 6 1 Q	19/02 (2006.01)	A 6 1 Q	19/02
C 0 7 C	41/50 (2006.01)	C 0 7 C	41/50
C 0 7 C	43/317 (2006.01)	C 0 7 C	43/317

(72)発明者 二瓶 賢一
 栃木県宇都宮市峰町 3 5 0 番地国立大学法人宇都宮大学内

(72)発明者 柳沢 忠
 栃木県宇都宮市峰町 3 5 0 番地国立大学法人宇都宮大学内

(72)発明者 飯郷 雅之
 栃木県宇都宮市峰町 3 5 0 番地国立大学法人宇都宮大学内

(72)発明者 大関 宏美
 栃木県宇都宮市西川田町 9 9 8 - 1 1

F ターム(参考) 4C057 AA17 BB02 DD01 JJ23
 4C083 AD391 AD392 BB51 CC04 DD27 DD38 EE16 FF01
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA08 MA01 MA04 MA17 MA63 NA14
 ZA89 ZC20
 4C206 AA01 AA02 AA03 AA04 CA19 KA01 MA01 MA04 MA28 MA37
 MA83 NA14 ZA89 ZC20
 4H006 AA01 AA03 AB12 AB20 AC43 GN38 GP05 GP11