

Chemical studies on α -glucosidase inhibitors from Indonesian medicinal plants

(インドネシア産薬用植物中の α -グルコシダーゼ阻害物質に関する化学的研究)

学位論文内容の要旨

Diabetes mellitus, associated cardiovascular diseases and cancer are an increasing problem around the globe, also in developing countries such as Indonesia. It was proposed that suppression of the activity of α -glucosidase enzymes would delay the degradation of starch and oligosaccharides, which would in turn cause a decrease in the absorption of glucose and consequently the reduction of postprandial blood glucose level elevation. Natural products have long proved to be valuable sources to develop a physiological functional food or lead compounds for antidiabetic therapy. Previous study has revealed potencies of Indonesian medicinal herbs for natural source of anti-diabetic treatment based on its inhibitory activity against α -glucosidase. In this study, further observation of these herbs on its chemical properties related to their its inhibitory activity against α -glucosidase was done, in particular for *Macaranga tanarius* and *Phyllanthus urinaria*.

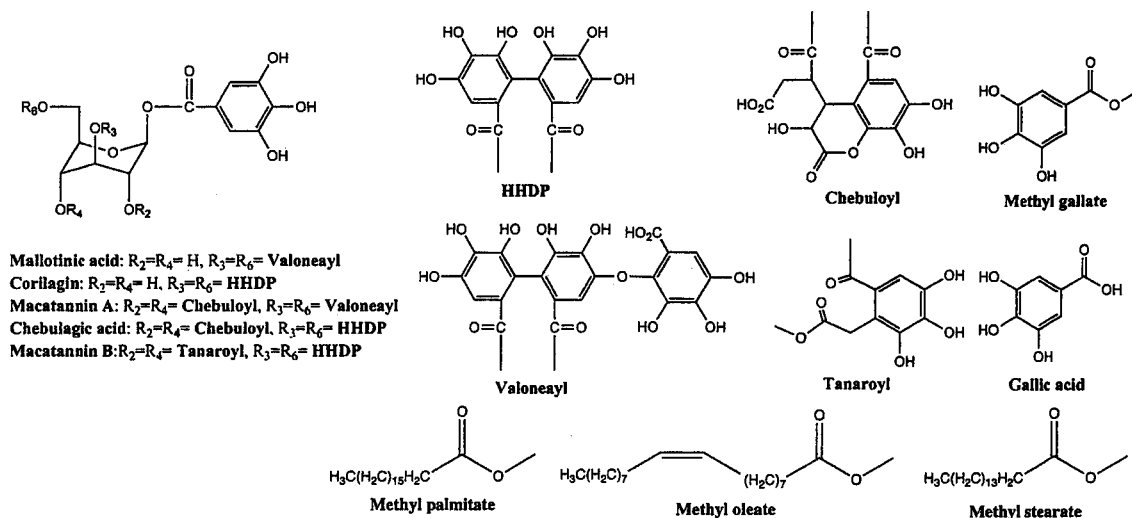
1. Maltase inhibitors from *Macaranga tanarius* leaves

Determination of prospecting herbs done *in-vitro* by using enzyme assay resulted in the finding of *Macaranga tanarius*, which showed a potent inhibitory activity. An EtOAc-soluble extract of *M. tanarius* leaves was chromatographed by a Diaion HP-20 column using water-MeOH gradient eluent and one of the active fractions was further purified with high performance liquid chromatography (HPLC, ODS, MeCN-water 10 : 90 to 20 : 80) to isolate methyl gallate, mallotinic acid, corilagin, and macatannin A as the active principles against maltase. Another active fraction was further chromatographed by a reverse phase ODS column using water-MeOH gradient eluent and purified with HPLC in the similar manner as before except for using MeCN-water 17 : 83 to 21 : 79 as gradient system to isolate chebulagic acid and macatannin B as the active principles against maltase. Macatannins A and B are novel compounds. The IC_{50} calculation shows that macatannin B ($IC_{50} = 0.55$ mM) has the highest inhibition among all ellagitannin isolated from *M. tanarius* leaves in this study followed by considerably

strong inhibition of macatannin A ($IC_{50} = 0.80$ mM), chebulagic acid ($IC_{50} = 1.00$ mM), and weak inhibition of corilagin ($IC_{50} = 2.63$ mM), and mallotinic acid ($IC_{50} > 5.00$ mM). Considering the amount of each ellagitannin in the whole extracts for *M. tanarius*, the activity of *M. tanarius* leaves might be a result of chebulagic acid (yield: 0.18%) while the presence of macatannins A and B (yield: 0.06% and 0.02%) also partly contributed to the activity.

2. α -Amylase inhibitors from *Phyllanthus urinaria*

Determination of prospecting herbs were being done *in-vitro* enzyme assay to evaluate their inhibitory activity against porcine pancreatic amylase (PPA) resulted in the finding of *Phyllanthus urinaria* and three other herbs to show a potent inhibitory activity. An EtOAc-soluble extract of the leaves of *P. urinaria* was chromatographed by a silica gel column using chloroform-MeOH gradient eluent. The polar active fractions (MeOH) were further purified with preparative HPLC (ODS, MeOH-water 20 : 80 to 60 : 40) to isolate active principles against PPA. Structure determination revealed that these isolated compounds were gallic acid, corilagin, and macatannin B, showing mild activity against PPA (Activity in 1 mM concentration: 23%, 21%, and 33%, respectively). The less polar active fractions of the silica gel column were fractionated by preparative thin layer chromatography (PLC, silica gel, hexane : EtOAc : formic acid = 8 : 2 : 0.1). The major fraction was further purified by silica gel PLC (hexane : chloroform : formic acid = 10 : 1 : 0.1 and then 20 : 1 : 0.1) to give a mixture of fatty acid esters: methyl palmitate, methyl oleate, and methyl stearate. Previous study had shown that fatty acids and fatty acid esters did show mild inhibition against PPA.



学位論文審査の要旨

主査	教授	川端	潤
副査	教授	原	博
副査	助教	加藤	英介

学位論文題名

Chemical studies on α -glucosidase inhibitors from Indonesian medicinal plants

(インドネシア産薬用植物中の α -グルコシダーゼ阻害物質に関する化学的研究)

本論文は英文 94 頁、図 51、表 19、引用文献 50 からなり、参考論文 2 編が付されている。

糖尿病は現代社会における重要な疾患のひとつであり、先進国のみならずインドネシアのような発展途上国においても大きな問題となっている。その予防および病態改善には食後高血糖の抑制および肥満の防止が効果的と考えられており、この目的で糖質の消化吸収にかかわる糖質水解酵素の活性を抑制する種々の天然および合成化合物が探索および利用されている。

本研究はヒトの摂取エネルギーの大半を占めるデンプンの消化にかかわる主要酵素である α -グルコシダーゼ（小腸マルターゼおよび膵臓アミラーゼ）の活性を阻害する天然成分の探索研究の一環として、インドネシア産の未開拓薬用植物を中心として活性成分の探索および単離同定を行ったものであり、内容は *Macaranga tanarius* 葉のマルターゼ阻害成分および *Phyllanthus urinaria* 葉のアミラーゼ阻害成分の二つの部分からなる。

Macaranga tanarius 葉のマルターゼ阻害成分

Macaranga tanarius はトウダイグサ科の高木で、その葉は一部で食品添加物等利用されている。本植物の葉の 50%メタノール抽出物に高いラット小腸マルターゼ阻害活性がみられたので、活性成分の単離同定を行った。メタノール抽出物を酢酸エチルと水で分配し、活性を示した酢酸エチル層を Diaion HP-20 による疎水性樹脂クロマトグラフィーに供し、水-メタノール系の段階溶出により分画した。活性画分はさらに逆相 ODS カラムクロマトグラフィー（水-メタノール）で精製した後、逆相 HPLC（水-アセトニトリル）で活性を示す主要ピークを分取した。得

られた活性成分（葉 1 kg からの収量、マルターゼ阻害活性の IC₅₀ 値）は、methyl gallate (472 mg, >5.00 mM)、mallotinic acid (660 mg, >5.00 mM)、corilagin (1328 mg, 2.63 mM)、macatannin A (584 mg, 0.80 mM)、chebulagic acid (1824 mg, 1.00 mM)、macatannin B (248 mg, 0.55 mM)であった。Methyl gallate 以外の 5 種の化合物はいずれも構造の類似したエラジタンニン類であり、そのうち、macatannin A および B と命名した 2 成分は文献未知の新規化合物であった。新規化合物の構造決定は、各種機器分析特に 1D、2D NMR の詳細な解析によって行い、macatannin A は chebulagic acid の HHDP 基が valoneayl 基に変わった構造、macatannin B は corilagin のグルコース 2 位水酸基にこれまでに例のない修飾ガロイル基である tanaroyl (3,4,5-trihydroxy-2-methoxycarbonylmethylbenzoyl)基がエステル結合した構造であると決定した。単離化合物の構造と活性の関係の考察では、グルコースの 3,6 位に結合している HHDP 基、valoneayl 基の違いは活性に影響せず、2,4 位への修飾ガロイル基のエステル結合が活性発現に寄与していると考えられた。ただし、いずれの化合物の活性もそれほど大きな違いはなく、粗抽出物の酵素阻害活性にはこれらエラジタンニン類が総合的に寄与していると考えられた。

Phyllanthus urinaria 葉のアミラーゼ阻害成分

Phyllanthus urinaria はトウダイグサ科の草本で、薬用植物として糖尿病、尿路疾患等に利用されている。本植物の 50%メタノール抽出物に高いブタ膵臓アミラーゼ阻害活性がみられたので、活性成分の単離同定を行った。メタノール抽出物を酢酸エチルと水で分配し、活性を示した酢酸エチル層をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム-メタノール）に供し、メタノールで溶出される高極性部を逆相 HPLC（水-メタノール）で活性を示す主要ピークを分取した。得られた活性成分（葉 1 kg からの収量、1 mM でのアミラーゼ阻害活性）は、gallic acid (84 mg, 23%)、corilagin (552 mg, 21%)、macatannin B (46 mg, 33%)であった。また、シリカゲルカラムクロマトグラフィーのクロロホルム溶出画分から、弱い活性を示す成分として脂肪酸メチルエステル混合物（パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸）を得た。本植物においても、酵素阻害活性には主としてエラジタンニン類が寄与しているものと考えられた。

以上の結果 *Macaranga tanarius* 葉および *Phyllanthus urinaria* 葉は抗糖尿病作用物質含有素材として有望であり、将来的にこの活性を生かした機能性食品開発への展開が期待できることが初めて明らかになったことは特筆すべき成果である。よって審査員一同は、Maria Dewi P.T. Gunawan-Puteri が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。