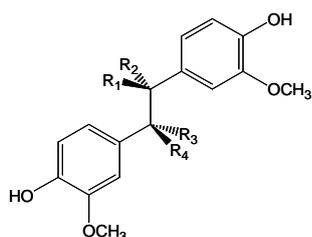


リュウキュウマツ *Pinus luchuensis* Mayr. 樹皮抽出物中の ポリフェノールの単離・同定及び抗酸化能

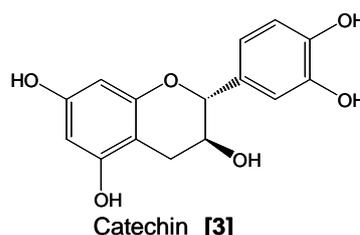
花ヶ崎敬資、田中真帆*、照屋正映

リュウキュウマツ樹皮の香粧品素材としての利用を図るため、リュウキュウマツ樹皮熱水抽出部をポリフェノール含量を指標に固相抽出、分取 HPLC により分画を行ったところ、4つのポリフェノール化合物を単離同定した。さらに、単離同定した化合物の抗酸化能を評価した。

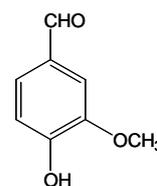


$R_1, R_4=H, R_2=CH_2OH, R_3=OH$ or $R_1=CH_2OH, R_2, R_3=H, R_4=OH$:
Threo-1,2-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,3-diol [1]

$R_1, R_3=H, R_2=CH_2OH, R_4=OH$ or $R_2, R_4=H, R_1=CH_2OH, R_3=OH$:
Erythro-1,2-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,3-diol [2]



Catechin [3]



Vanillin [4]

1 はじめに

リュウキュウマツ (*Pinus luchuensis* Mayr.) は琉球列島固有の種であり沖縄県木に指定されたマツ科マツ属の針葉樹である¹⁾。沖縄において王府時代から木造船材などに用いられ古い歴史がある¹⁾。現在では、家具や小木工への活用が図られ主要県産木材となっている²⁾。これを用材として利用する場合、樹皮や用材に不適な材木など未利用部が発生するため有効利用が求められている。

ところで、マツ科植物にはポリフェノール類であるタンニンが含まれることが知られている³⁾。フランス海岸松の樹皮抽出物からは抗酸化物質のピクノジェノールが注目を集め⁴⁾、多くの香粧品に利用されている。リュウキュウマツにおいては樹皮などにジテルペン類を含み抗ガン活性などがあることが報告^{5),6)}され、機能性が確認されている。

本研究では、リュウキュウマツの樹皮から香粧品素材として有用な成分を単離することを目的としてポリフェノール含量を指標に各種クロマトグラフィーによる分画を行った。さらに、分画により得られた化合物を美白効果の指標であるチロシナーゼ阻害活性や DPPH 抗酸化試験を行った。

2 実験方法

2-1 試料

試料は、2010年7月15日に国頭村森林組合（国頭村字与那）において、用材として用いるリュウキュウマツから樹皮部分を剥ぎ落としたものを、水で洗浄した後、温風乾燥し、粉碎機 MF10 ベーシック (IKA) にて粉碎したものをを用いた。

2-2 機器および試薬

抽出は高速溶媒抽出装置 ASE200 (日本ダイオネクス) を用いた。粗ポリフェノール画分の調製は合成吸着樹脂 DIAION HP20 (以下 HP20) (三菱化学) を充填したオープンカラムクロマト管 (80mmI.D.×300mm) を用いた。分取 HPLC は、送液システム (Waters 600E Multi Solvent Delivery System)、逆相カラム (Waters Symmetry C18, 20mmI.D.×300mm) を使用し、紫外可視吸光検出器 (Waters

2487 Dual λ Absorbance Detector) により 210nm および 278nm で検出、または送液システム (Waters Alliance 2690 Separations Module)、逆相カラム (YMC-Pack ODS-AQ, 6.0mmI.D.×150mm) を使用し、フォトダイオードアレイ検出器 (Waters 996 Photodiode Array Detector) で検出した。HPLC の移動相には、超純水、特級メタノール (ナカライテスク)、高速液体クロマトグラフ用アセトニトリル (ナカライテスク) を使用した。LC/MS による分析は、送液システム (Waters Alliance 2695 Separations Module)、逆相カラム (YMC-Pack ODS-AQ,

*非常勤職員

3.0mmI.D.×150mm)、フォトダイオードアレイ検出器 (Waters 996 Photodiode Array Detector)、四重極型質量分析装置 (Quattro micro™ API Detector) を用いた。移動相はギ酸 (東京化成工業)、超純水、高速液体クロマトグラフ用アセトニトリル (ナカライテスク)、高速液体クロマトグラフ用メタノール (ナカライテスク) を使用した。¹H および ¹³C-NMR スペクトルは JNM-LA400 (日本電子) を使用して測定し、DMSO-*d*₆ の溶媒シグナル (δ_H2.49, δ_C39.5) を基準として用いた。マイクロプレートリーダーは 750nm の吸光度を Thermo MULTISKAN FC で、490nm、515nm の吸光度を Bio-Tek instruments ELx 800 Universal Microplate Reader で測定した。ポリフェノール含量の測定には、Folin-Ciocalteu 試薬 (Merck)、特級炭酸ナトリウム (和光純薬工業) を使用した。DPPH ラジカル消去活性試験には、2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (以下 MES) (和光純薬工業)、trolox (和光純薬工業)、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (以下 DPPH) (和光純薬工業) を使用した。

2-3 ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール含量は Folin-ciocalteu 法⁷⁾で測定した。適宜希釈した試料溶液に 10%Folin-Ciocalteu 試薬、10%炭酸ナトリウムを同量加え、1 時間室温放置後、マイクロプレートリーダーで 750nm の吸光度を測定した。検量線は没食子酸を用いて作成し、ポリフェノール含量は溶液 1mL あたりの没食子酸相当量 (μg gallic acid eq./mL) として算出した。

2-4 DPPHラジカル消去活性試験

ラジカル消去活性は沖ら⁸⁾の方法に準じて測定した。96 穴マイクロプレートに段階的に希釈した試料溶液、0.2M MES 緩衝液 (pH6.0)、50%エタノールをそれぞれ 50 μL ずつ加え、さらに 0.8M DPPH 溶液 50 μL を加えて攪拌し、室温で 20 分間放置後、マイクロプレートリーダーで 515nm の吸光度を測定した。DPPH ラジカル消去活性は Trolox 相当量として算出した。

2-5 抽出

抽出は ASE200 にて以下の条件で行った。抽出液は分離を行うまで冷蔵保存した。

試料・セライト比：1 対 1 抽出試料量：380g
 抽出セル：33mL 使用セル数：150 本
 抽出溶媒：超純水 抽出温度：130℃
 抽出圧力：1500psi 抽出時間：10 分
 抽出回数：2 回

フラッシュボリューム：50% パージ時間：180 秒

2-6 分離

ポリフェノール類の分離過程を図 1 に示す。抽出液を HP20 に通液し吸着させ水で洗浄した後、メタノール濃度 (V/V) を段階的に変えて溶出させた (20、40、60、80、100%メタノール画分)。各画分のポリフェノール含量の比較から 40%、60%メタノール画分 (それぞれ 608mg、631mg gallic acid eq.) が高いことが分かった。

40%、60%メタノール画分からは、分取 HPLC により [1]、[2]、[3]、[4]を得た。

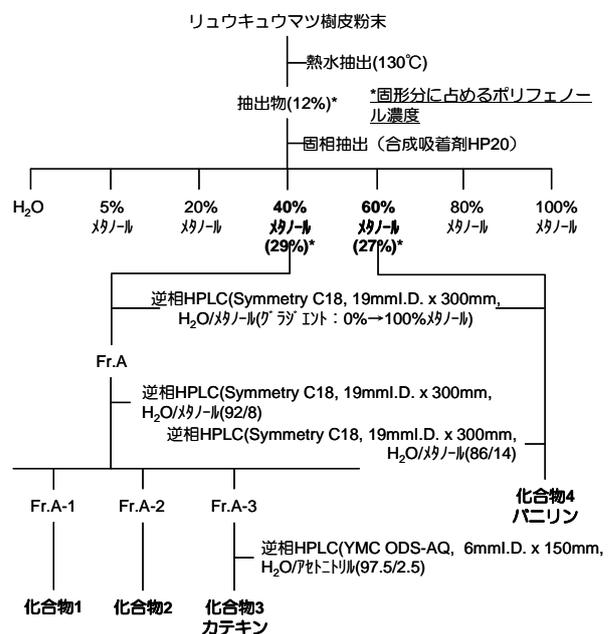


図1 化合物の分離過程

2-7 LC/MSの分析条件

カラム温度:25℃、流速;0.45mL/min、移動相:1%ギ酸/超純水/メタノール[10/82/8 (V/V)]([1], [2])、1%ギ酸/超純水/メタノール[10/78/12 (V/V)]([3])、1%ギ酸/超純水/アセトニトリル[10/86/4 (V/V)]([4])、検出:ESI ポジティブイオンモード、イオンソース温度:110℃、デゾルベーション温度:350℃、キャピラリー電圧:3.2kV、コーン電圧:10V([1], [2])、20V([3])、25V([4])で行った。

3 実験結果と考察

3-1 ポリフェノール類の単離と同定

[1]、[2]は ESI-MS による分子イオンピーク m/z 303 (M-18)⁺から分子量 320 であると推測された。類似の化合物 2a の ¹³C-NMR ケミカルシフトの文献値⁹⁾との比較から、[2]は erythro-1,2-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-

propane-1,3-diol と同定した (表1、図2)。化合物 2a (エリスロ型) は水酸基を持つ不斉炭素が二つあることから、フィッシャー投影式において水酸基が同じ側に配置されるエリスロ型と、水酸基が互いに反対側に配置されるトレオ型の二つのジアステレオマーが存在する⁹⁾(図3)。**[1]**は化合物 2a と比較して α 炭素のシフト値がずれていること、また、**[1]**、**[2]**の α 水素のダブルレットのカップリング定数 (それぞれ 8.4Hz、4.8Hz) と文献値⁹⁾ (トレオ、エリスロ型それぞれ 8Hz、6Hz) の比較から**[1]**は化合物 2a のジアステレオマーである threo-1,2-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,3-diol と同定した。

表1 **[1]**、**[2]**、2aの¹³C-NMRデータ

	[1]	[2]	2a
OCH ₃	55.5	56.0	56.2
OCH ₃	56.1	56.0	56.3
β	56.2	56.2	56.7
γ	66.1	63.9	64.5
α	78.3	74.3	75.5
B-2	111.7	111.4	111.6
A-2	113.8	114.4	114.6
B-5	114.9	114.9	115.4
A-5	115.3	115.1	115.6
B-6	120.5	119.8	120.3
A-6	122.1	122.9	123.1
A-1	132.6	136.3	136.4
B-1	136.2	136.3	136.4
A-4	145.7	145.7	146.1
B-4	146.1	145.9	146.5
A-3	147.6	147.7	148.3
B-3	147.8	148.0	148.4

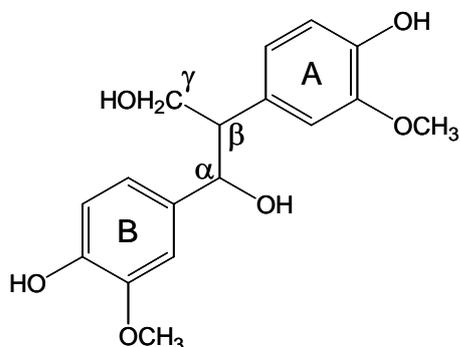
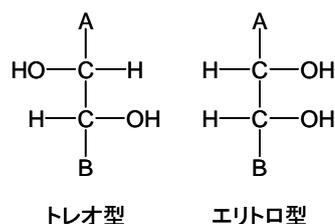


図2 **[1]**、**[2]**、2aの構造



トレオ型 エリスロ型

図3 **[1]**、**[2]**のジアステレオマー

[3]は、ESI-MS による分子イオンピーク m/z 291 (M+H)⁺ から分子量は 290 であると推測され、catechin 標品の ¹³C-NMR スペクトルデータの比較から catechin と同定した。

[4]は、ESI-MS による分子イオンピーク m/z 169 (M+H)⁺ から分子量は 168 であると推測され、vanillin 標品の ¹³C-NMR スペクトルデータとの比較から vanillin と同定した。また、実際に分取した**[4]**からは、LC-MS 分析結果でもう一つのピークが存在し、vanillin が酸化された vanillic acid であると推測された (図4)。Vanillic acid 標品の LC-MS 分析結果との比較により、**[4]**に混入している化合物は vanillic acid と同定された。**[4]**に vanillic acid が混合している理由として、HPLC 分析では二つのピークは離れているため、HPLC の分取により一緒に分取された可能性は低いと考えられる。しかし、濃縮の過程で空気に晒され、vanillin が酸化され vanillic acid が生成した可能性は考えられる。Vanillic acid は vanillin の酸化銀による酸化で生成される¹⁰⁾ ことが報告されていることから、vanillic acid についても評価試験を行い抗酸化能について考察した。

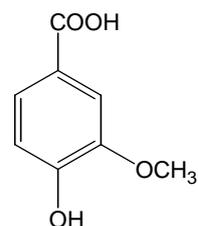


図4 Vanillic acid

3-2 化合物のDPPHラジカル消去活性

[1]、**[2]**、catechin、vanillin、vanillic acid について、抗酸化能の指標となる DPPH ラジカル消去活性試験を行った。結果を表 2 に示す。catechin、vanillin、vanillic acid はいずれも標品を用いた。Catechin が最も高い 9.7mmol-trolox eq./g を示し、トレオ型の**[1]**が 3.3mmol-trolox eq./g、エリスロ型の**[2]**が 2.6mmol-trolox eq./g、vanillin は活性が弱く測定できなかったが、vanillic

acid は 0.7mmol-trolox eq./g を示した。

表2 単離化合物のDPPHラジカル消去活性

化合物	DPPH ラジカル消去活性 (mmol-trolox eq./g)
[1]	3.3
[2]	2.6
Catechin	9.7
Vanillin	弱
Vanillic acid	0.7

3-3 単離化合物の美白効果

Catechin の DPPH ラジカル消去活性は 9.7mmol-trolox eq./g であったが、他の抗酸化試験である ORAC 法では 46mmol-trolox eq./g を示し他のポリフェノール化合物より高い値を示すと報告されている¹¹⁾。また、catechin はヒト表皮メラノサイトにおいてチロシナーゼの阻害が報告されている¹²⁾。

Vanillin と vanillic acid においては、本研究の DPPH ラジカル消去活性試験と同様に vanillic acid が vanillin より強いフリーラジカル消去活性が報告されている¹³⁾。さらに、マウスメラノーマ B16F0 細胞で vanillic acid はチロシナーゼ阻害活性、DOPA オキシダーゼ、メラニン含量を減少させたと報告されている¹³⁾。このように、リュウキュウマツ樹皮において美白効果のあるポリフェノール化合物が単離され、化粧品素材としての利用の可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 琉球林業協会, 沖縄産有用木材の性質と利用
- 2) 工芸指導所 20 年のあゆみ, 沖縄県工芸指導所
- 3) Fukuchi K., Sakagami H., Ikeda M., Kawazoe Y., Oh-Hara T., Konno K., Ichikawa S., Hata N., Kondo H., Nonoyama M., Inhibition of herpes simplex virus infection by pine cone antitumor substances, *Anticancer Res.*, **1989**, 9, 313-317
- 4) Packer L., Rimbach G., Virgili F., Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol, *Free Radic Biol Med.*, **1999**, 27, 704-724
- 5) Wada SI., Iida A., Tanaka R., Triterpene constituents from the stem bark of *Pinus luchuensis* and their DNA topoisomerase II inhibitory effect. *Planta Med.*, **2001**, 67, 659-664
- 6) Minami T., Wada S., Tokuda H., Tanabe G., Muraoka O., Tanaka R., Potential antitumor-promoting diterpenes from

the cones of *Pinus luchuensis.*, **2002**, 65, 1921-1923

- 7) Oki, T., Matsuda, M., Furuta, S., Nishiba, Y., Terahara, N. And Suda, I., Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars, *J.Food. Sci.*, 67, 1752-1756 (2002) .
- 8) 沖智之, 増田真美, 吉田収, 西場洋一, 須田郁夫, 紫サツマイモを原材料としたチップスのラジカル消去活性, *食科工*, **2001**, 48, 926-932
- 9) Miki K., Takehara T., Sasaya T., Sakakibara A., Lignans of *Larix Leptolepis*, *Phytochemistry*, **1980**, 19, 449-453
- 10) 化学大辞典, 東京化学同人, **1989**, 1793
- 11) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, 山崎光司, 津志田藤二郎, 食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して, *化学と生物*, **2009**, 47, 4
- 12) Kur-Ta CHENG, Feng-Lin HSU, Shih-Hui CHEN, Peng-Ke HSIEH, Hsu-Shan HUANG, Ching-Kuo LEE, and Mei-Hsien LEE, New Constituent from *Podocarpus macrophyllus* var. *macrophyllus* shows anti-tyrosinase effect and regulates tyrosinase-related protein and mRNA in human epidermal melanocytes, *Chem. Pharm Bull.* **2007**, 55, 757-761
- 13) Tzung-Han Chou, Hsiou-Yu Ding, Wei Jing Hung, Chia-Hua Liang, Antioxidative characteristics and inhibition of α -melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*, *Exp Dermatol.*, **2010**, 19, 742-750

*評価研究課題名：リュウキュウマツ未利用部の有効利用法に関する研究（課題ID:2010 技 004）

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。