

# 沖縄産天然抗酸化物質の探索とその応用研究 — モモタマナ中の抗酸化成分の単離と同一 —

市場俊雄、安仁屋洋子<sup>1</sup>

## 1 はじめに

近年、糖尿病・高血圧・ガンなどの疾病の病態に活性酸素が関与していることが明らかとなってきている。従って活性酸素を消去する抗酸化物質は疾病予防・健康保持に極めて重要であり、抗酸化物質の摂取は健康増進・疾病予防の大きな戦略となりうる。我々はこれまで地域コンソーシアム研究開発事業等で、沖縄産薬草の強い抗酸化作用を検討し、健康増進・疾病予防に活用できる魅力ある資源であることを確認している。

昨年度、薬草ベニバナボロギク (*Crassocephalum crepidioides* S. Moore) 中の抗酸化成分の単離と同一を行い、この薬草が有望な抗酸化天然資源であることを報告した。今年度はそれに引き続き薬草モモタマナ (*Terminalia catappa* L.) 中の抗酸化成分の分離を試みた。その結果、2種のフラボノイド (化合物1、2) と2種のエラジタンニン (化合物3、4) を単離し、主に核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの解析により同一したので報告する。

## 2 実験方法

### 2-1 装置

溶媒抽出には、ダイオネクスの高速溶媒抽出装置ASE 200を用い、抽出槽はASE200専用のステンレス製33mL抽出槽を用いた。

抽出物の分析では、高速液体クロマトグラフィー装置 (HPLC) にウォーターズAlliance (送液部: 2690、検出器: 996、データ処理: Millennium32) およびポリマーラボの光散乱検出器PL-ELX 1000を用い、カラムとしてインタクトのCadenza CD-C18 (4.6mm×50mm、3 $\mu$ m) を使用した。

成分の粗分離には三菱化学の合成樹脂DIAION HP20 (40mm×150mmガラスオープンカラム) および三鬼エンジニアリングの遠心向流クロマトグラフィー装置 (CPC) を使用した。精製にはウォーターズの高速度液体クロマトグラフィー装置 (送液部: 600E、検出器: UV9486、データ処理: Millennium32) とウォーターズのSymmetry C18 (19mm×300mm、7 $\mu$ m) カラムを用いた。

また、ゲルろ過では東ソーのTOYOPEARL HW40F

(20mm×500mmガラスカラム) を使用した。

構造決定では、日本電子の核磁気共鳴装置 (NMR) JNM-400および質量分析装置 (MS) JMS-700を使用した。

### 2-2 試薬および試料

琉球大学から供給された乾燥薬草を、粉碎機にて2分程度粉碎を行った後篩い分けし、粗粒子 (>2mm) および微粒子 (<0.85mm) を取り除き、ポリプロピレン製の保存容器で抽出を行うまで保存した。

抽出溶媒にはエタノール (EtOH、ナカライテスク、一級試薬) と純水 (上水を蒸留後脱イオン) を使用し、抽出の際のマトリックスとしてセライト (ナカライテスク、スーパーセル) を用いた。

クロマトグラフィー用のメタノール (MeOH、関東化学、特級)、酢酸エチル (EtOAc、関東化学、特級)、および純水は0.5 $\mu$ mメンブレンでフィルターし使用した。

1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH)、トリフルオロ酢酸 (TFA) は和光純薬の特級試薬を用いた。

### 2-3 ラジカル消去能の測定

#### 2-3-1 試料の調製

抗酸化活性を測定する試料は、遠心エバポレーターで乾固した後秤量し、エタノール/水1:1溶液を加えて1mg/mLの濃度に調整して活性測定用の試料とした。

#### 2-3-2 DPPHラジカル消去作用の測定

DPPH/マイクロプレート法を用いEC<sub>125 $\mu$ M}</sub> (effective concentration for 125 $\mu$ M: 125 $\mu$ MのDPPHラジカルを消去するのに有効な濃度) を算出する方法で測定した。

### 2-4 HPLCでの分析に用いた条件

分析は以下に示す条件で行った。

カラム温度: 45 $^{\circ}$ C、流速: 1 mL/min、検出: 210-600nmでのマックスプロット

溶媒系:

Time(min)	MeOH(%)	0.1%TFA(%)	カーブ
0	5	95	
10	100	0	直線
12	100	0	—

<sup>1</sup>琉球大学医学部保健学科生体機能学教室

2-5 HPLCでの分取に用いた条件

分取は以下に示す条件で行った。

カラム温度：室温、流速：8 mL/min、検出：280nm

溶媒系：

Time(min)	MeOH(%)	0.1%TFA(%)	カーブ
0	5	95	
45	100	0	直線

分画：1分ごとにフラクションコレクタで自動分取

2-6 成分の抽出および単離

2-6-1 抽出

抽出は以下の条件を用いASE200にて行い、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：70g

抽出セル：33mL 使用セル数：14本

抽出溶媒：エタノール 抽出温度：100℃

抽出圧力：1500psi 抽出時間：10分

抽出回数：2回

パージボリューム：50% パージ時間：180秒

2-6-2 分離

まず抽出液を減圧下で濃縮し、エタノールを除去後蒸留水に懸濁させHP20カラムに通した。カラムを水で洗浄した後、メタノール濃度を上げながら吸着物を溶出させた。溶出フラクションはDPPHにより抗酸化活性を測定し、活性を示した3フラクション（40%、60%、80%

メタノール溶出)をまとめた後、HW40FまたはCPCを用いて精製を行った。まずHW40Fを使った分離では、3つのフラクションが得られ、それぞれをHPLCにより精製することで化合物1、2、3を得た。またCPCを使って得られた分離フラクションのうちCPC-Fr.1をさらにHPLCで精製し化合物3を得た。一方CPC-Fr.2をさらにHW40Fカラムで分離し、最終的にHPLCで精製することにより化合物4が得られた(図1)。

3 結果と考察

化合物1と2はNMRスペクトル上にクエルセチンに特徴的な幾つかのシグナルが見られた。またこのクエルセチン由来のシグナルのほか、糖に特徴的な酸素と結合した炭素がそれぞれ6本と12本観測されたことからクエルセチンの一配糖体および二配糖体ではないかとかと考え、これまでにグアバから単離したクエルセチン配糖体とスペクトルを比較したところ、イソクエルシトリン(クエルセチン-3-グルコシド)およびルチン(クエルセチン-3-ルチノシド)であると同定できた(図2)。

化合物4はその<sup>13</sup>C-NMRスペクトルから27個の炭素があることが分かり、ケミカルシフトよりヘキサヒドロキシジフェノ酸(HHDP)、没食子酸、グルコースがその構成要素であることが推定された(図3)。

そこで、モモタマナから報告のあるこれらの部分構造を持つ化合物を検索したところコリラジンがヒットした。

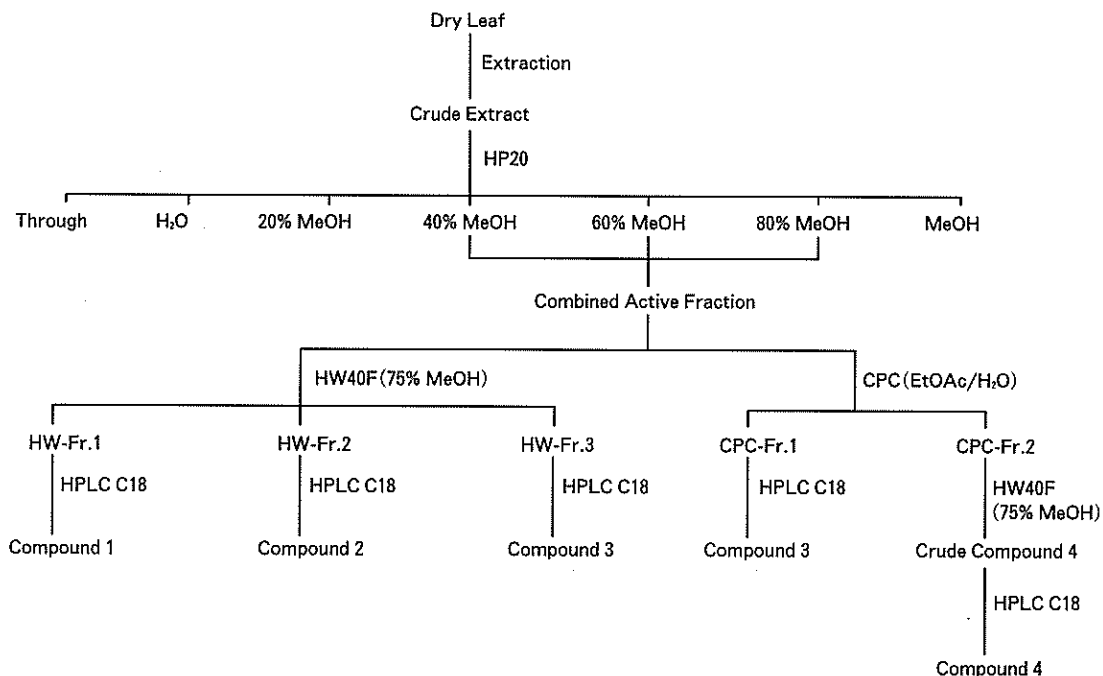


図1 モモタマナ中の抗酸化性成分の分離スキーム



図2 化合物1と2の構造

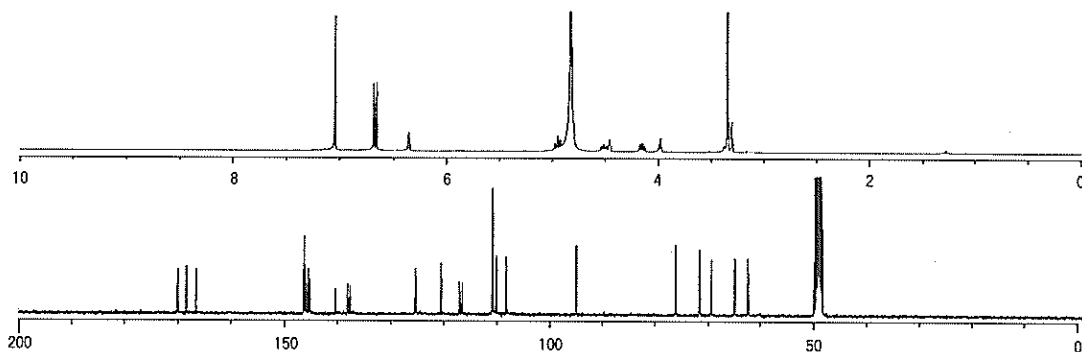
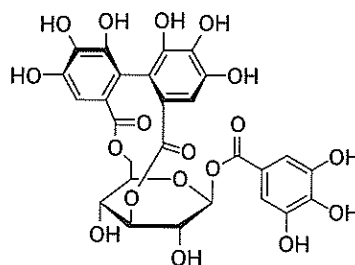


図3 化合物4の<sup>1</sup>H-NMR (上)と<sup>13</sup>C-NMR (下)スペクトル

そこで化合物4のNMRスペクトルデータを文献値と比較したところ良く一致するため、化合物4をコリラジンであると同定した(図4)。

一方、化合物3はAPCI-LR-MSより分子量が954 (m/z955にMH<sup>+</sup>が観測された)であることが分かり(図5)、NMRからHHDP、没食子酸、グルコース部分があることが示唆された。



Corilagin

図4 化合物4の構造

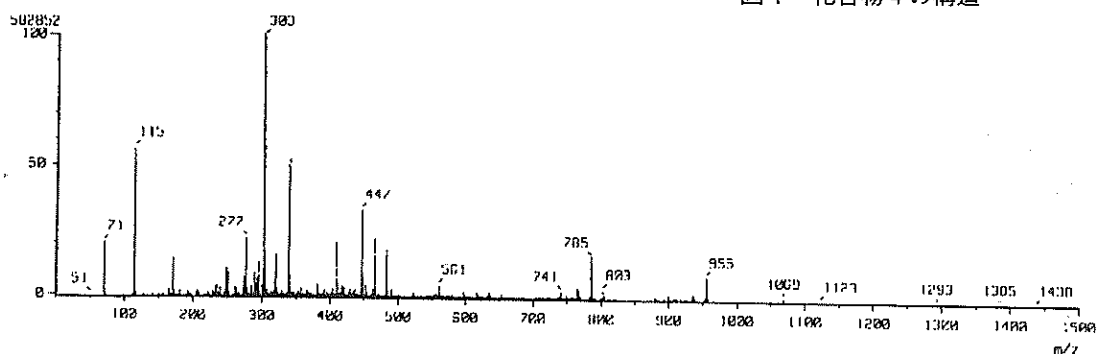


図5 化合物3のAPCI-MSスペクトル

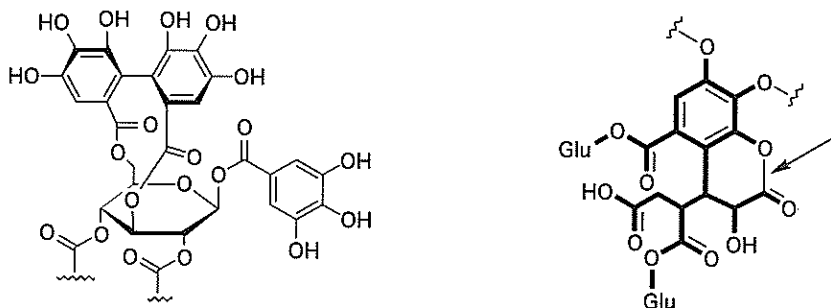


図6 化合物3の部分構造

さらに<sup>1</sup>H-NMRおよび<sup>13</sup>C-NMRスペクトルデータの比較により、化合物4のグルコースの2,4位がエステル化された化合物であることが分かった(図6左図)。さらに化合物3は化合物4に比べて<sup>13</sup>C-NMRスペクトル上で炭素が14個多いことが分かり、一次元(1D)、DEPT、COSY、HMQCおよびHMBCスペクトルの解析により炭素骨格が明らかとなった(図6右図)。

一方、化合物3の不飽和度は、MSと<sup>13</sup>C-NMRスペクトルデータから導き出される推定分子量C<sub>41</sub>H<sub>30</sub>O<sub>27</sub>から計算して25と思われ、上記部分構造中に後一つ環構造があることが分かった。部分構造中で、無理無く環構造をとれるのは、没食子酸のベンゼン環上でカルボニル基に対してメタ位にある酸素が、上記(図6右図中の矢印)のようにエステル結合により環を形成する場合のみである。そこで残る2個の芳香族環上の酸素を水酸基とすることでMSおよびNMRスペクトルデータを満足する構造が導かれた(図7)。

この構造を検索したところ、既知のケブラグ酸がヒットした。そこで化合物3のスペクトルデータを文献値と比較したところ一致したので、これをケブラグ酸であると同定した。

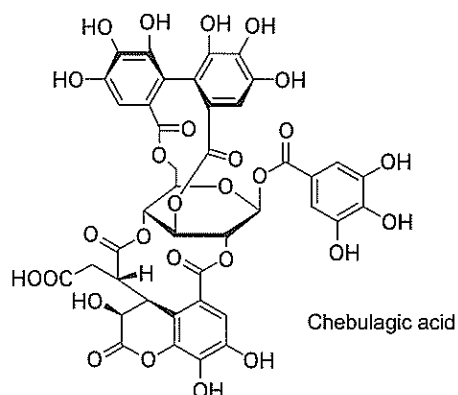


図7 化合物3の構造

#### 4 まとめ

今回の研究で、モモタマナの抗酸化成分の単離・同定を行った。その結果、DPPHによる抗酸化性活性を指標に2種のフラボノイド(化合物1、2)と2種のエラジタンニン(化合物3、4)を単離し、主に核磁気共鳴(NMR)スペクトルの解析により同定した。これらのなかでフラボノイドは相対的に微量な成分であり、エキスの抗酸化性活性への寄与は少ないと思われる。一方、タンニンはこのエキスを構成する主要な成分であることから、これらがモモタマナの抗酸化性活性の中心であると思われる。

モモタマナからは、これまでも多くのタンニン類が単離されている。それらタンニンには抗酸化性活性や抗

菌活性があることが分かっており、今後天然の抗酸化性剤や抗菌剤の原料となりうる。今回の研究では2種類のタンニンを同定するにとどまったが、この植物を今後有用な天然素材として開発を進めるためさらに詳細な成分検索が必要である。

#### 謝辞

今回の研究は一部文部省の平成13年度科学研究費「地域連携推進研究費」により行いました感謝致します。

#### 参考文献

- 1) 平成10年度地域コンソーシアム研究開発事業成果報告書「有用生物資源の多目的利用のための加工製造システムの研究開発」 財団法人南西地域産業活性化センター 平成12年
- 2) 村上孝夫著 天然物の構造と化学 廣川書店(1987)
- 3) Carbon-13 NMR of Flabonoids (studies in organic chemistry 39) Elsevier (1989)
- 4) Carbon-13 NMR Spectroscopy John Wiley & Sons (1988)
- 5) Dictionary of Natural Products on CD-ROM Chapman & Hall (2000)
- 6) Schmidt, O.T. et al. Annalen 571 p232 (1951)
- 7) Reddy, K.K. et al. Aust. J. Chem. 17 p238 (1964)
- 8) Matsuda, H. et al. Chem. Pharm. Bull. 14 p877 (1966)
- 9) Jochims, J.C. et al. Annalen 717 p169 (1968)
- 10) Seikel, M. et al. Phytochemistry 9 p1115 (1970)
- 11) Haddock, E.A. et al. J.C.S. Perkin 1 p2535 (1982)
- 12) Okuda, T. et al. Tetrahedron Lett. 23 p3937 (1982)
- 13) Haslam, E. et al. J.C.S.(C) p2381 (1967)
- 14) Yoshida, T. et al. Chem. Pharm. Bull. 28 p3713 (1980)
- 15) Yoshida, T. et al. Chem. Pharm. Bull. 30 p2655 (1982)
- 16) Haddock, E.A. et al. J.C.S. Perkin 1 p2535 (1982)
- 17) Nonaka, G. J. Nat. Prod. 53 p587 (1990)
- 18) Hecht, S.M. et al. J. Nat. Prod. 55 p401 (1992)

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。