

樹皮のフリーラジカル消去作用と フラボノイド成分について

平松 緑、大江知生、高橋知子

Abstract

Scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and flavonoid contents in three kinds of extract [water, a mix of water/ethanol (1:1), and ethanol] of bark following sugi (*Cryptomeria japonica* *Cryptomeria*), kuromatsu (*Pinus thunbergii*), akamatsu (*Pinus densiflora*), kihada (*Phellodendron amurense*), keyaki (*Zelkova serrata*), sakura (*someiyoshino*; *Prunus x yedoensis*), shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*), aodake (*mousouchiku*; *Phyllostachys heterocycla*), kurochiku (*Phyllostachys nigra* var. *nigra*) were examined using electron spin resonance spectrometry and high-pressure liquid chromatography, respectively. All extracts of akamatsu, sugi and kihada showed high DPPH radical scavenge activity. In addition, high scavenging activities were found in both extracts of ethanol and water/ethanol of aodake, sakura and kuromatsu, in water/ethanol extract of keyaki and in ethanol extract of shirakanba. In the case of flavonoids, high contents of myricetine and naringin in the akamatsu, epicatechin, naringin, apigenin and catechin in the sakura, apigenin in the kuromatsu, naringin in the keyaki, isoflavone and caffeine in the sugi and naringin in the aodake were found. Shirakaba showed lowest contents of flavonoids in these of bark. From these data it was found that all bark had free radical scavenging activity, and the scavenging activity was suggested to be partly due to the contained flavonoids.

1. はじめに

老化をはじめ、がん、心臓病、脳卒中、糖尿病などの生活習慣病には活性酸素ラジカルが大いに関係していることが知られている¹⁾。老化の進展を遅延し、生活習慣病を予防するために、ビタミンC、ビタミンE、ポリフェノールなどの数多くの活性酸素ラジカルを消去する抗酸化物の健康食品が市場に出回っている。

ピクノジェノールはフランス南西部のポルドー地方とピレネー山脈の間にあるビスケー湾の海岸に生育する松の樹皮を水抽出した食品である。ピクノジェノールにはプロアントシアニジンが60%以上及びその他多種類のフラボノイドが含まれ、優れた抗酸化性が示されている。また免疫機能の改善、神経細胞死の抑制、動脈硬化の予防に良い効果が明らかにされている²⁾。フラバン茶（サントリー株式会社）はフランスの海岸で生育している松をフランス南西部ランド地方で植林し、その松の樹皮を抽出して得たフラバンジェノールを多く含んでいる清涼飲料水である³⁾。また、秋田県由利郡矢島町には赤松の樹皮を餅にまぜ、松皮餅として食されている⁴⁾。

酒田市は国際貿易港が隣接し、諸外国から多量の木材が輸入され、その廃棄樹皮も莫大な量となっている。そこで樹皮の有効利用を考え、抗酸化作用を検討した。また樹皮の成分についても検索をおこなった。

2. 実験方法

(1) 実験材料

国産のスギ (*Cryptomeria japonica*)、クロマツ (*Pinus thunbergii*)、アカマツ (*Pinus densiflora*)、キハダ (*Phellodendron amurense*)、ケヤキ (*Zelkova serrata*)、サクラ (*someiyoshino*; *Prunus x yedoensis*)、シラカンバ (*Betula platyphylla var. japonica*)、アオダケ (*mousouchiku*; *Phyllostachys heterocycla*) 及びクロチク (*Phyllostachys nigera var. nigera*) の樹皮を使用した。これらをナイフで樹木から剥ぎ取り試料とした。対照としてピクノジェノール（株式会社トレードピア）を用いた。

(2) 試料の抽出

抽出液には①エタノール(99.5%)、②水とエタノールとの混合溶液(1:1)及び③水を使用した。樹皮1gに抽出液を20ml加え、24時間放置したのち10,000回転にて10分間冷却遠心をし、得られた上清を実験に用いた。

(3) フリーラジカルの分析

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルをエタノールに溶解して30 μ Mとした。試料100 μ lを試験管にとり、30 μ M DPPH 溶液を100 μ l加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、扁平セルにとり、40秒後に電子スピン共鳴装置(JEOL JES-RE1X)でDPPHラジカル濃度を分析した。

電子スピン共鳴装置の測定条件は、磁場を1.250 G、磁場変調を9.42 G、応答時間を0.1秒、マイクロ波出力を12 mW及び磁場掃引速度を0.5分とした。

(4) フラボノイドの分析

フラボノイドの用いた標準試料は、(-)-epigallocatechin(EGC)、caffeine、(-)-catechin、(-)-epicatechin(EC)、(-)-epicatechin gallate (ECg)、naringin、myricetine、fisetin、isoflavone- β 、apigenin、kaempferol、diosmetin、baicalein、propyl-p-hydrobenzoate、acacetin、galangin、baicalin、hesperetin、naringenin、taxifolin及びtaurocyamineである。

高速液体クロマトグラフィーの測定条件は、カラムにDionex Acclaim 120 (C183 μ m 120 A 4.6x150 mm)、溶離液に10 mM リン酸及び10 mM アセトニトリル、流量を1.0 ml/min、検出器に日本ダイオネクス(株)UVD170U、測定吸光波長に210 nm、254 nm、280 nm、保持時間を36分とした。なお液体クロマトグラフには日本ダイオネクス(株)P680 HPLCを用いた。

3. 実験結果

(1) DPPH ラジカル消去作用

DPPH ラジカルの構造式を図1に示した。DPPH ラジカルは窒素原子に電子をもつフリーラジカルである。電子スピン共鳴装置で DPPH ラジカル分析すると、5本線のシグナルが検出される(図2)。両端のシグナルはマンガンの外部標準として用いた。濃度は最もシグナルの高さが高い DPPH ラジカルの真中のシグナルの高さに対する左側のマンガンシグナルの高さに対して相対比で求めた。

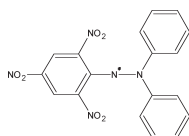


図1 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ラジカルの構造図

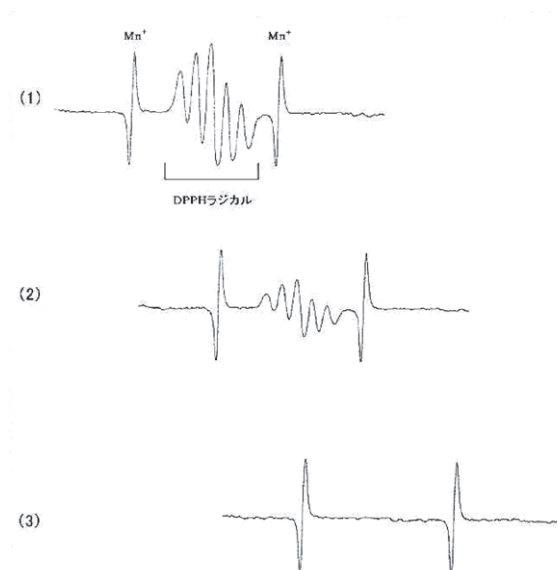


図2 ピクノジェノール（エタノール抽出）の1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) ラジカルに対する消去作用スペクトラム (1) ピクノジェノール抽出液濃度 0 %、(2) ピクノジェノール抽出液濃度 0.2 % 及び (3) ピクノジェノール抽出液濃度 100 %。

(2) ピクノジェノール

0.2 % 及び 100 % ピクノジェノール / エタノール溶液に 15 μ M DPPH 溶液を加えた時の残存ラジカルのスペクトラムを図 2 に示した。100 % ピクノジェノール / エタノール溶液は完全に 15 μ M DPPH ラジカルを消去したが、0.2 % ピクノジェノール / エタノール溶液の場合には DPPH ラジカルの 5 本線のシグナルが残存していた。

ピクノジェノール / エタノール溶液の IC₅₀ (15 μ M DPPH ラジカルのシグナルの高さを半減する濃度) は 0.16 %、水 / エタノール混液の IC₅₀ は 0.31 %、水抽出は 3.97 % であった。

(3) 樹皮

スギ、アカマツ及びキハダは、水抽出液、水 / エタノール混液の抽出液及びエタノール抽出液のいずれにおいても、15 μ M DPPH ラジカルはほとんど消去していた (IC₅₀: スギの水抽出液 4.46 %、水 / エタノール混液抽出液 4.04 %、エタノール抽出液 4.02 %。アカマツの水抽出液 5.20 %、水 / エタノール混液抽出液 0.24 %、エタノール抽出液 0.12 %。キハダの水抽出液 4.42 %、水 / エタノール混液抽出液 4.23 %、エタノール抽出液 4.65 %)。

クロマツ、サクラ及びアオダケにおいては、水 / エタノール混液の抽出液及びエタノール抽出液は 15 μ M DPPH ラジカルをほとんど消去していた (IC₅₀: クロマツの水 / エタノール混液抽出液 4.22%、エタノール抽出液 7.82 %。サクラの水 / エタノール混液抽出液 4.5 %、エタノール抽出液 0.78 %。アオダケの水 / エタノール混液抽出液 3.38 %、エタノール抽出液 3.5 %) が、水抽出液においてはアオダケを除いてほとんど消去していなかった (IC₅₀: クロマツ 96.3 %、サクラ 100 %)。アオダケでは水抽出液の IC₅₀ は約 40.2 % であった。クロチクとケヤキにおいては水 / エタノール混液の抽出液は 15 μ M DPPH ラジカルをほとんど消去していた (IC₅₀: クロチク 5.49 %、ケヤキ 3.42 %) が、水抽出液は全く消去せず、エタノール抽出液の IC₅₀ はクロチクで約 24.1 %、ケヤキで 76.8 % であった。一方シラカンバにおいてエタノール抽出液は完全に 15 μ M DPPH ラジカルを消去 (IC₅₀ は 0.41 %) し、水 / エタノール混液の抽出液の IC₅₀ は 22.5 %、水抽出液の IC₅₀ は 85.6 % であった (図 3)。

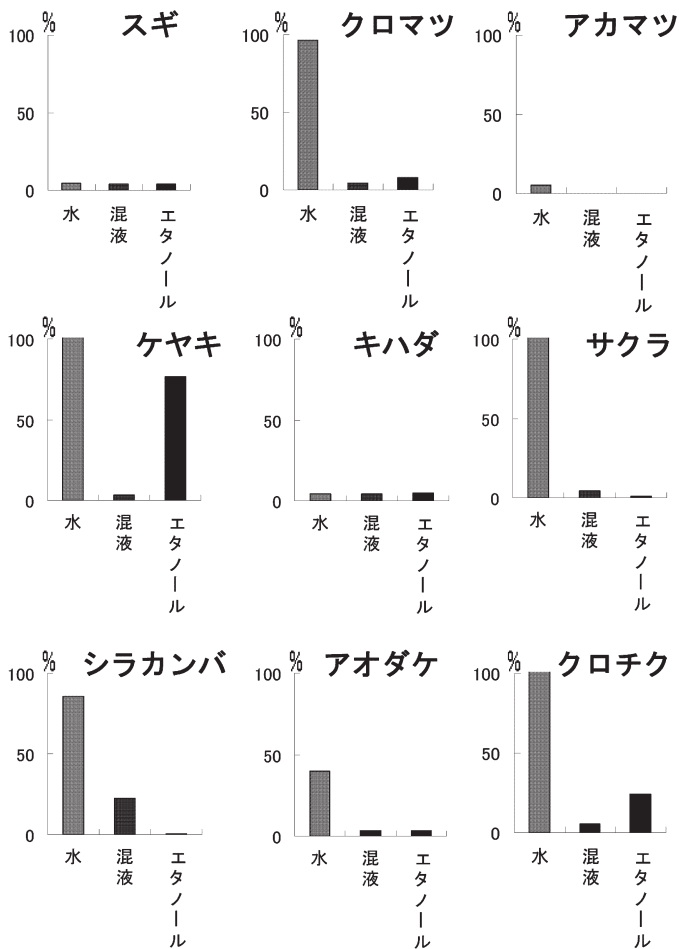


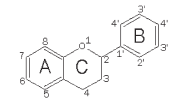
図3 9種類の樹皮の異なった抽出液による1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl IC₅₀の比較

2. フラボノイド

(1) ピクノゼノール

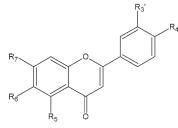
フラボノイドの用いた標準試料すなわち、(-)-epigallocatechin(EGC)、caffeine、(-)-catechin、(-)-epicatechin(EC)、(-)-epicatechin gallate(ECg)、naringin、myricetin、fisetin、isoflavone- β 、apigenin、kaempferol、diosmetin、baicalein、propyl-p-hydrobenzoate、acacetin、galangin、baicalin、hesperetin、naringenin、taxifolin 及び taurocyamine の構造式を図4-1～3に示した。

フラボノイド基本骨格



Flavones

	5	6	7	3'	4'
Apigenin	OH	H	OH	H	OH
Acacetin	OH	H	OH	H	OCH ₃
Baicalein	OH	OH	OH	H	H
Baicalin	OH	OH	Glycoside	H	H
Diosmetin	OH	H	OH	OH	OCH ₃



Flavonols

	5	7	3'	4'
Naringenin	OH	OH	H	OH
Naringin	OH	Rhamnoglucoside	H	OH
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃

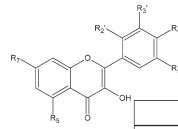
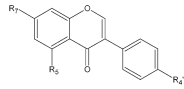


図 4-1 標準品の構造図

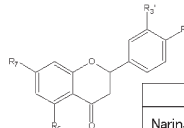


Isoflavones

	5	7	4'
Isoflavone	H	H	H

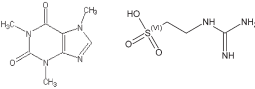
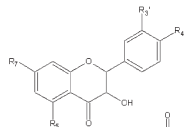
Flavanones

	5	7	3'	4'
Naringenin	OH	OH	H	OH
Naringin	OH	Rhamnoglucoside	H	OH
Hesperetin	OH	OH	OH	OMe



Flavanonols

	5	7	3'	4'
Taxifolin	OH	OH	OH	OH



Caffein Taurocyamine

図 4-2 標準品の構造図

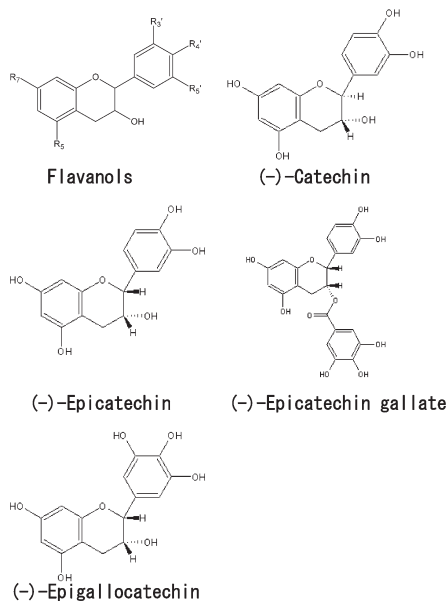


図 4-3 標準品の構造図

ピクノゼノールにおいては、水抽出液により caffeine (40 μ g/ml) と naringin (38 μ g/ml) が検出され、水 / エタノール混液の抽出液では caffeine (77 μ g/ml)、epigallocatechin (46 μ g/ml)、naringin (616 μ g/ml) が、エタノール抽出液では naringin (27 μ g/ml) と myricetin (199 μ g/ml) が検出された。

(2) 樹皮

アカマツにおいては、水抽出液では caffeine (36 μ g/ml)、naringin (24 μ g/ml) が、水 / エタノール混液の抽出液では catechin (44 μ g/ml) と naringin (54 μ g/ml) が、エタノール抽出液では naringin (29 μ g/ml) と myricetin (164 μ g/ml) が検出された。酒田市のアカマツにはピクノゼノールとほぼ同じフラボノイド成分が含まれていた。クロマツにおいて水 / エタノール混液の抽出液では apigenin (90 μ g/ml) が検出されたが、水抽出液及びエタノール抽出液にはフラボノイドは検出されなかった (表 1-1)。

スギの樹皮水抽出液には caffeine (36 μ g/ml)、catechin (21 μ g/ml) が検出され、水 / エタノール混液の抽出液では galangin (22 μ g/ml)、エタノール抽出

液では isoflavone (25 $\mu\text{g/ml}$) が検出された。ケヤキの樹皮では、水抽出液に epigallocatechin (21 $\mu\text{g/ml}$)、水 / エタノール混液の抽出液に acacetin (30 $\mu\text{g/ml}$)、naringin (63 $\mu\text{g/ml}$) が検出されたが、エタノール抽出液には何も検出されなかった。キハダの樹皮には、水抽出液に acacetin (22 $\mu\text{g/ml}$)、水 / エタノール混液の抽出液に acacetin (26 $\mu\text{g/ml}$) が検出され、エタノール抽出液には何も検出されなかった。サクラの樹皮には水抽出液に acacetin (30 $\mu\text{g/ml}$)、naringin (31 $\mu\text{g/ml}$) が検出され、水 / エタノール混液の抽出液では acacetin (28

表 1-1 9 種類の樹皮の異なった抽出液中のフラボノイドの比較 (20 $\mu\text{g/ml}$ 以上)

溶 液	ピクノゼノール ($\mu\text{g/ml}$)	アカマツ ($\mu\text{g/ml}$)	クロマツ ($\mu\text{g/ml}$)	
水	Caffeine 40 Naringin 38 (IC ₅₀ 3.97%)	Caffeine 36 Naringin 24 (IC ₅₀ 5.20%)	(IC ₅₀ 96.3%)	
水 エタノール混液	Caffeine 77 Epigallo- catechin 46 Naringin 616 (IC ₅₀ 0.31%)	Catechin 44 Naringin 54 (IC ₅₀ 0.24%)	Apigenin 90 (IC ₅₀ 4.22%)	
エタノール	Naringin 27 Myricetin 199 (IC ₅₀ 0.16%)	Naringin 29 Myricetin 164 (IC ₅₀ 0.12%)	(IC ₅₀ 7.82%)	
溶 液	スギ ($\mu\text{g/ml}$)	ケヤキ ($\mu\text{g/ml}$)	キハダ ($\mu\text{g/ml}$)	サクラ ($\mu\text{g/ml}$)
水	Caffeine 36 Catechin 21 (IC ₅₀ 4.46%)	Epigallo- catechin 21 (IC ₅₀ 100%以上)	Acacetin 22 (IC ₅₀ 4.42%)	Acacetin 30 Naringin 31 (IC ₅₀ 100%以上)
水 エタノール 混液	Galangin 22 (IC ₅₀ 4.04%)	Acacetin 30 Naringin 63 (IC ₅₀ 3.42%)	Acacetin 26 (IC ₅₀ 4.23%)	Acacetin 28 Apigenin 50 Naringin 135 (IC ₅₀ 4.50%)
エタノール	Isoflavone 25 (IC ₅₀ 4.02%)	(IC ₅₀ 76.8%)	(IC ₅₀ 4.65%)	Acacetin 41 Apigenin 66 Epicatechin 171 (IC ₅₀ 0.78%)

(注) IC₅₀は、1,1-diphenyl-picrylhydrazyl ラジカルに対して。

$\mu\text{g/ml}$)、naringin ($135\ \mu\text{g/ml}$) apigenin ($50\ \mu\text{g/ml}$)、エタノール抽出液では acacetin ($41\ \mu\text{g/ml}$)、apigenin ($66\ \mu\text{g/ml}$)、epicatechin ($171\ \mu\text{g/ml}$) が検出された (表 1-1)。

シラカンバの3種類の抽出液にはいずれもフラボノイドは検出されなかった。アオダケには水/エタノール混液の抽出液に naringin ($32\ \mu\text{g/ml}$)、エタノール抽出液に myricetin ($164\ \mu\text{g/ml}$) が検出されたが、水抽出液には検出されなかった。クロチクには水/エタノール混液の抽出液に apigenin ($25\ \mu\text{g/ml}$)、naringin ($20\ \mu\text{g/ml}$) が検出されたが、水及びエタノール抽出液にはフラボノイドは検出されなかった (表 1-2)。

表 1-2 9種類の樹皮の異なる抽出液中のフラボノイドの比較 ($20\ \mu\text{g/ml}$ 以上)

溶 液	シラカンバ ($\mu\text{g/ml}$)	アオダケ ($\mu\text{g/ml}$)	クロチク ($\mu\text{g/ml}$)
水	(IC_{50} 85.6%)	(IC_{50} 40.2%)	(IC_{50} 100%以上)
水・エタノール 混液	(IC_{50} 22.5%)	Naringin 32 (IC_{50} 3.38%)	Apigenin 25 Naringin 20 (IC_{50} 5.49%)
エタノール	(IC_{50} 0.41%)	Myricetin 164 (IC_{50} 3.50%)	(IC_{50} 24.1%)

(注) IC_{50} は、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ラジカルに対して。

4. 考 察

ピクノゼノールは現在種々の健康食品や化粧品に含まれて販売されている。ピクノゼノールにはプロアントシアニジンが60%以上含まれ、さらに多くのフラボノイドなど (caffeine, naringin, epigallocatechin, naringin, myricetin) も検出された。また、すぐれた DPPH ラジカル消去作用が示された。これと同じ現象が今回アカマツに認められた。また含まれているフラボノイド成分は caffeine, naringin, catechin, naringin, myricetin であった。

DPPH ラジカル消去作用に関しては、スギ、アカマツおよびキハダのこれら

樹皮における水抽出液、水/エタノール混液抽出液及びエタノール抽出液はいずれも強い消去作用が示された。しかしこれらの各抽出液に検出されたフラボノイドに共通性は認められなかった。またクロマツ、ケヤキ、サクラ、シラカンバ、及びクロチクの各樹皮の水抽出液の DPPH ラジカル消去作用はほとんど無かった。これらのいずれにおいてもフラボノイドはほとんど検出されていないか、あってもほぼ $20 \mu\text{g/ml}$ であった。

顕著にフラボノイドの量が多くみられたのは、ピクノゼノールとアカマツの樹皮に、naringin と myricetin、クロマツの樹皮に apigenin、サクラの樹皮に naringin と epicatechin、アオチクに myricetin であり、そのほか少ないながらも種々の樹皮に見出されたフラボノイドなどは acacetin、caffeine、catechin、epigallocatechin、galangin、isoflavone であった。それらの構造を図5に示した。

フラボノイドのなかでは、脂質過酸化抑制、一重項酸素、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシド及び過酸化水素などの活性酸素の消去作用が明らかに

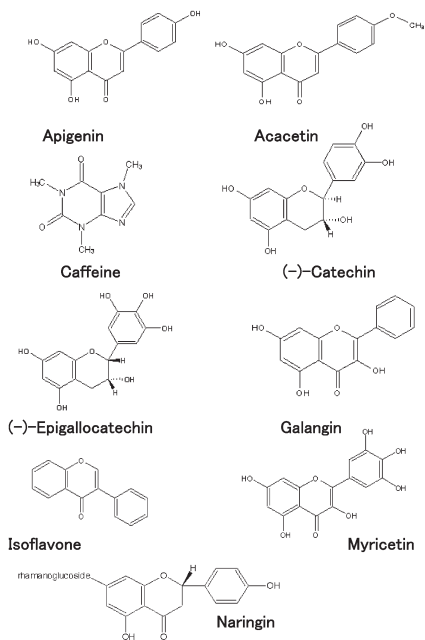


図5 9種類の樹皮に多く含まれていたフラボノイドなど

されている^{5,6)}。フラボノール類はスーパーオキシドを消去し、ヒドロキシルラジカルの消去作用はB環上の水酸基数の多いほうが、B環上の水酸基数の少ないものと比べて強い。C-4位のカルボニル基の存在は消去活性に大きく関係している。B環に水酸基が2-3個あり、C環の2,3位に二重結合、3位に水酸基を有するものはラジカルが安定で、かつ連鎖を強く停止させる⁷⁾。

DPPH ラジカルに関しては、galangin、myricetin、baicalein、kaempferol、quercetin 及び fisetin に消去作用が見出されている⁸⁾が、さらに hesperetin、naringin 及び naringenin にも消去作用が報告されている⁹⁾。

以上のことを勘案すると、樹皮抽出液中の DPPH ラジカルの消去作用には検出されたフラボノイドが関与していること、及び DPPH ラジカルを消去する他の成分が樹皮中に含まれている可能性の高いことが明らかとなった。

参考文献

1. Hiramatsu M., Yoshikawa T., and Packer L. eds., *Molecular Interventions in Lifestyle-Related Diseases*, CRC Press, 2006.
2. 平松 緑 ピクノジェノール, (株)シーエムシー, 266-278, 1999.
3. <http://www.suntory.co.jp/softdrink/flavancha/index.html>
4. TBS, 「ベストタイム」2003年12月5日放送.
5. Yang B., Kotani A., Arai K. and Kusu F., Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, *Analytical Sciences* 17, 599-604, 2001.
6. Furuno K., Akasako T. and Sugihara, N., The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bull.* 25, 19-23, 2002.
7. 奥田拓男 1994 薬物代謝, 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃 真編, 抗酸化物質, 学会出版センター, 263-275.
8. Furusawa M., Tanaka T., Ito T., Nishikawa A., Yamazaki N., Yakaya K., Matsuura N., Tsuchiya H., Nagayama M. and Iinuma M. Antioxidant activity of

hydroxyflavonoids, J. Health Science, 51, 376-378, 2005.

9. Miyake Y., Manotao K., Fukumoto S., Yamamoto K., Oya-Ito T., Kawakishi S and Osawa T. New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with *Aspergillus saitoi* from flavanone glycoside in citrus fruit, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1443-1450, 2003.