

春ウコン葉に含まれる生理活性物質

南 久美子*、松岡 由記子*、河越 義晴**、森本 正則*、駒井 功一郎*

*近畿大学農学部農芸化学科 **株式会社八日路

Biological active substances in aerial parts of *Curcuma aromatica*

Kumiko MINAMI*, Yukiko MATSUOKA*, Yoshiharu KAWAGOE**, Masanori MORIMOTO*
and Koichiro KOMAI*

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University,
3327-204 Nakamachi, Nara, 631-8505, Japan

**Yashiro Co. Ltd., 29-17, kanedencho, suite, Osaka, 564-0045, Japan

Synopsis

Haru-ukon (*Curcuma aromatica*) has been cultivated for healthy foods and traditional folk medicines for long years. Only rhizome of *C. aromatica* is using for these purposes, and the many aerial parts are disposed. As even high costly disposing process may also cause some environmental pollution, we focused on the using the leaves of *C. aromatica* as bio-resource of useful chemicals. In the first screening guided tyrosinase inhibitory activity, the alcoholic extract of the leaves of *C. aromatica* showed high anti-oxidizing and tyrosinase inhibitory activity. The extract was consisted from many amounts of terpenoids by GC-MS analysis. Two compounds have been isolated and identified as neocurdione and curcumenone by fractionation guided tyrosinase inhibitory and SOD activity. Both natural products showed same efficacy of biological activity as arbutin known as cosmetics skin-whitening agent on the SOD and tyrosinase inhibitory assay. Though, the field of cosmetic or healthy food need new natural product, take advantage of waste bio-material is reasonable and lead to promoting of sustainable agriculture.

緒 言

近年、有機系廃棄物の増加とそれらの処理をめぐっては環境や美観の側面から社会問題となっている。春ウコン (*Curcuma aromatica*) の根茎部は、ガンや生活習慣病予防効果を持つことから機能性食品として古くから利用されている¹⁾。しかし、地上部は乾燥後チップとして農地へ鋤込む以外の利用はなく、その多くが廃棄処分されている。しかし、ウコン葉にはテルペノイドに由来すると思われる特有の芳香があり、その蓄積量も多いことから、これらの有効利用が望まれる。ウコンなどのショウガ科植物には昆虫に対する殺虫忌避成分の報告もあり^{2,3)}、多くの機能性天然物が未だ未利用なままである。本研究では、福岡県山門郡山川町で生産されている春ウコン葉部に含まれる有用成分の機能を検索することによって、これらの有機系廃棄物の有効利用についての知見を得ることを目的とした。

含有成分の活性評価には、美白作用物質の評価法であるチロシナーゼ阻害活性、活性酸素消去作用と共に抗微生物活性試験を実施した。

材料および方法

本研究で用いた試薬類は特に記述しない限り

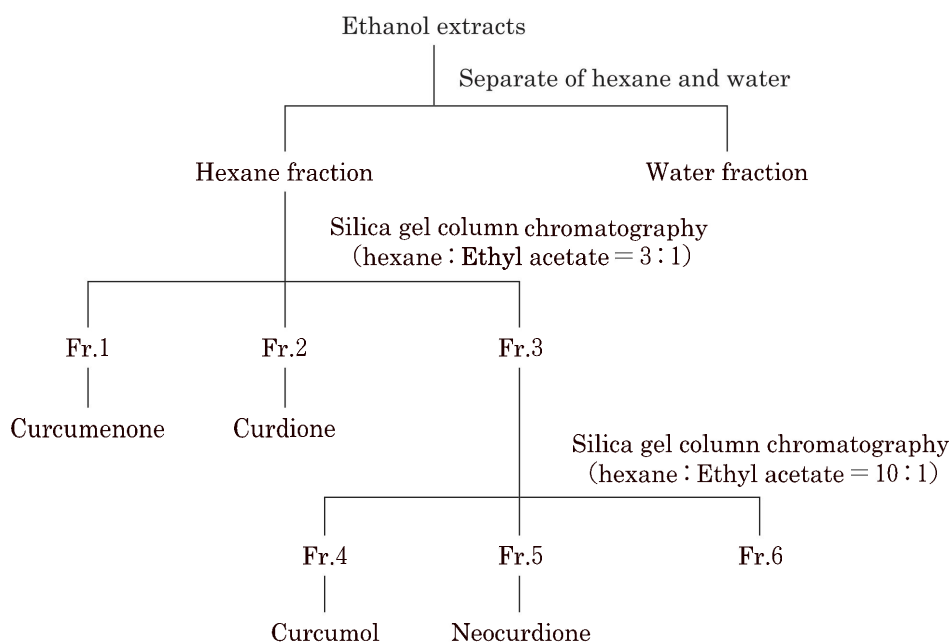


Fig. 1 Fractionation of ethanol extracts from *C. aromatica* leaves

和光純薬株式会社より購入した試薬をそれ以上精製せずに用いた。有効成分の同定には、NMR JEOL EX270 (270MHz)、MS Shimadzu GCMS 9100-mk、分光光度計 Beckman Coulter DU 640、融点測定機 Yanako 微量融測定器を用いた。

1. 春ウコン葉部からの活性成分の抽出ならびに単離・同定

福岡県山門郡山川町産の春ウコン乾燥葉 20kg をエタノール 20L に浸漬し、得られた抽出液を減圧濃縮して抽出物 (179.3g) を得た。得られたエタノール抽出物は水に溶解後、抽出物中の精油成分をヘキサンで抽出した。得られたヘキサン相は無水硫酸ナトリウムで脱水後減圧濃縮しヘキサン画分 (0.64g) を得た。一方水画分はロータリーエバポレーターにて減圧濃縮し、水画分 (150.6g) を得た。ヘキサン画分 (0.49g) は、シリカゲル (富士シリシア化学, BW-127ZH) カラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 3:1) を用いて分画し、3画分 (Fr. 1: 0.2g, Fr. 2: 0.04g, Fr. 3: 0.12g) を得た (Fig. 1)。さらに、Fr. 3 をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 10:1) により 3画分 (Fr. 4: 24mg, Fr. 5: 15mg, Fr. 6: 29mg) に分画した。

2. L-DOPAを基質としたチロシナーゼ阻害試験

チロシナーゼ (EC 1.14.18.1) はL-tyrosineをL-DOPAに酸化すると共にL-DOPAをDOPAキノンに酸化させる生体酵素である。DOPAキノンはシミやそばかすの原因物質であるメラニンの原因物質であることから、チロシナーゼを阻害することでシミやそばかすの生成を防ぐことが可能であると考えられる。

20% DMSO含有リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した試料 (20 μ L) に0.01M L-DOPAを含む基質 (100 μ L) に懸濁した酵素液 (マッシュルーム由来チロシナーゼ30U, SIGMA社製, 20 μ L) をよく混合し、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽中で15分間酵素反応させた。その後、反応停止液として0.1M HCl水溶液 (20 μ L) を加えた (S)。同時に基質と試料の代わりにリン酸緩衝液を用いたもの (S-BI)、試料の代わりにリン酸緩衝液を用いたもの (BI) を調製した。

酵素反応後、リン酸緩衝液 (pH6.8) を測定ブランクとして475nmにおける吸光度を測定し、式1に従ってチロシナーゼ阻害率 (%) を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{BI - (S - S \cdot BI)}{BI} \times 100$$

… (式1)

3. 活性酸素抑制効果試験^{4,6)}

先に述べたチロシナーゼは紫外線によって生じた活性酸素を引き金として、皮膚の基底層に存在するメラノサイトと呼ばれる細胞内で生産される。つまり、チロシナーゼの阻害に加えて、チロシナーゼの活性上昇を引き起こす活性酸素を効果的に抑制することができれば、美白効果も期待できると考えられる。

活性酸素抑制効果はSOD Activity Detection Kit (和光純薬社製) を用いて、標準操作法に従って測定した。

20% DMSO水溶液とした蒸留水に溶解させた試料溶液10mLに発色試薬 (キサンチン0.4mMとニトロブルーテトラゾリウム0.24mM含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH8.0)) 0.1mLを加え、1分間攪拌した。続いて酵素懸濁液 (キサンチンオキシダーゼ (Butter milk由来) 0.049U/mLを0.1Mリン

酸緩衝液 (pH8.0) に懸濁したもの) 0.1mLに加え37 $^{\circ}$ Cの恒温槽中で28分間反応させた後、速やかに反応停止液 (690mMドデシル硫酸ナトリウム, 20mL) を加えて5分間攪拌した (S)。

同時に、試料の代わりに同体積の蒸留水を用いたもの (BI)、酵素液の代わりにブランク液を用いたもの (S-BI)、および試料溶液の代わりに同体積の蒸留水を用い、さらに酵素液の代わりにブランク液を用いたもの (BI-BI) を調製した。

このようにして調製した試験溶液は、蒸留水を測定ブランクとして560nmにおける吸光度から式2に従って活性酸素阻害率 (%) を算出した。

$$\text{活性酸素阻害率} = \frac{(BI - BI \cdot BI) - (S - S \cdot BI)}{(BI - BI \cdot BI)} \times 100$$

… (式2)

4. 抗微生物活性試験

細菌、糸状菌、酵母の各種微生物に対する抗微生物活性は、ペーパーディスク法ならびにマイクロプレート法を用いて実施した⁷⁾。供試試料は各成分とも0.1M濃度に調製した。

結 果

1. 有効成分の単離・同定

春ウコンアルコール抽出物のヘキサン可溶画分についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=3:1) による分画 (Fr.1:0.2g, Fr.2:0.04g, Fr.3:0.12g) を行った結果、Fr.1からCurcumenone (0.2g)、Fr.2からCurdione (30mg) を得た。さらに、Fr.3をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=10:1) により3画分 (Fr.4:24mg, Fr.5:15mg, Fr.6:29mg) に分画した結果、Fr.4からCurcumol (1.2mg)、Fr.5からNeocurdione (12mg) を得た。(Fig.1, 2)

2. チロシナーゼ阻害活性およびSOD活性

単離・同定した化合物についてチロシナーゼ阻害活性試験およびSOD活性試験を行った。

ここで、活性指標標準物質としてArbutin (4-

hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside) を用いて活性比較を行った。その結果ほぼ同等の活性がみられた (Table 1, 2)。

3. 抗微生物活性試験

ペーパーディスク法ならびにマイクロプレート法の結果を Table 3. に示した。

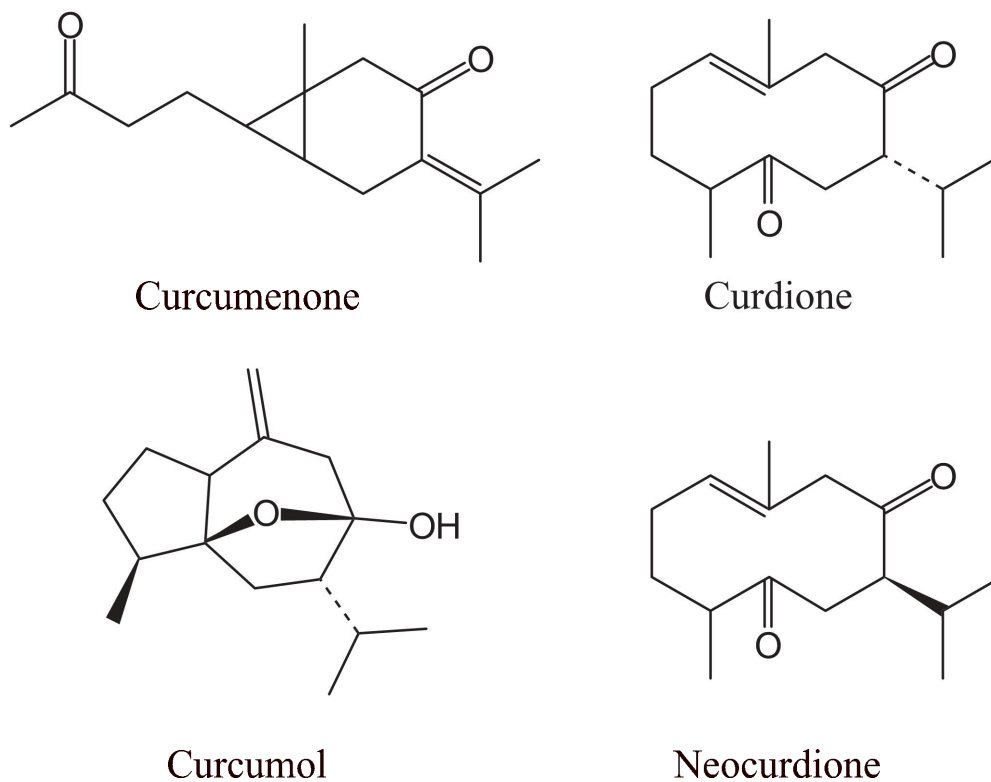


Fig. 2 Sesquiterpenes isolated from *C. aromatica* leaves

Table 1. Inhibitory activity of tyrosinase on isolated compounds from *C. aromatica*

Treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)				
	Curcumenone	Curdione	Neocurdione	Curcumol	*Arbutin
125	25.3	30.5	52.4	31.5	55.7
250	58.6	48.8	61.6	74.0	56.6
375	74.9	77.2	85.1	88.2	61.6

*Arbutin used in this enzyme assay as positive control

N=3

Table 2. SOD activity and inhibitory activity of tyrosinase in *C. aromatica*

Sample	Tyrosinase Inhibition (%)	SOD activity (%)
	Treatment: 125 $\mu\text{g/ml}$	Treatment: 40 $\mu\text{g/ml}$
Ethanol extracts	35.7	34.4
Hexane fraction	36.6	15.7
Water fraction	31.2	8.8
Fr.1	25.3	6.3
Fr.2	22.5	7.7
Fr.3	26.4	2.5
Fr.4	39.4	inactive
Fr.5	52.4	3.0
Fr.6	36.5	1.3

Table 3. Antimicrobial activity of Neocurdione and Curcumol isolated from *C. aromatica* leaves

Tested micro-organisms	Neocurdione		Curcumol	
	Paper Disk	Microplate	Paper Disk	Microplate
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Flavobacterium lutescens</i>	++	++	++	++
<i>Escherichia coli</i>	+++	+++	++	+++
<i>Micrococcus luteus</i>	+	++	+	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	++	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	+	+	+	+
<i>A. japonicus</i>	-	+	-	++
<i>A. oryzae</i>	++	++	+	+
<i>A. sojae</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	++	++	+	+
<i>F. oxysporum</i>	++	++	+	+
<i>Penicillium islanadicum</i>		-		-
<i>Candida sake</i>	-	-	-	-
<i>C. diddensii</i>	+	+	-	-
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	+	+	+	-

+++ : highly active, ++ : active, + : slightly, - : inactive

4. 春ウコン精油成分と有効成分

得られた精油成分のGC分析の結果、確認された成分は未同定成分を含めると209成分に及んだ。そのうち含有量が1%以上で質量分析のフラグメントデータから同定された成分は1,8-Cineole, Linalool, α -Terpineol, Caryophyllene oxide, Curdione, Germacrone, Neocurdione, Curcumolなどで、ピーク強度から推測される主成分は、NeocurdioneとCurcumolであった。

Curcumenone⁸⁾

白色針状結晶 m.p. 118.5–119.5°C, CI-MS m/z 235 [M-H]⁺ ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 0.45 (1H, dt, J =3.0, 6.0 Hz, H-1), 1.60 (2H, m, H-2), 2.53 (2H, d, J =3.0 Hz, H-3), 0.67 (1H, q, J =4.0 Hz, H-5), 2.82 (2H, br. s, H-6), 2.48 (2H, q, J =7.5 Hz, H-9), 1.80 (3H, s, H-12), 2.09 (3H, s, H-13), 1.10 (3H, s, H-14), 2.12 (3H, s, H-15); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm) 18.9, 19.9, 23.3, 23.3, 24.0, 27.9, 29.9, 43.8, 48.8, 127.9, 147.3, 208.7, 201.6

Curdione

白色針状結晶 m.p. 61–62°C, EI-MS m/z 236 (M⁺, 8.0%); 237 (2.2%), 180 (100%), 167 (80.7%), 140 (23.9%), 109 (79.5%), 95 (34.1%), 82 (37.5%), 69

(96.6%),

Curcumol

白色針状結晶 m.p. 141–142°C, EI-MS m/z 236 (M⁺, 5.6%); 237 (1.1%), 180 (79.5%), 167 (59.1%), 140 (19.3%), 109 (62.5%), 95 (25.0%), 82 (34.1%), 69 (100%),

Neocurdione⁹⁾

無色結晶 m.p. 45–49°C, CI-MS m/z 237 [M-H]⁺, ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 5.17 (1H, br. d, J =8.0, 10.0 Hz, H-1), 2.08–2.14 (2H, m, H-2), 1.59 (2H, m, H-3), 2.33 (1H, m, H-4), 2.35 (1H, dd, J =2.0, 15.0 Hz, H-6), 2.68 (1H, dd, J =9.0, 15.0 Hz, H-6), 2.84 (1H, dt, J =2.0, 9.0 Hz, H-7), 2.94 (1H, d, J =11.0 Hz, H=9), 3.05 (1H, d, J =11.0 Hz, H-9), 1.85 (1H, m, H-11), 0.91 (3H, d, J =6.5 Hz, H-12), 0.86 (3H, d, J =6.5 Hz, H-13), 0.96 (3H, d, J =7 Hz, H-14), 1.65 (3H, s, H-15), ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm) 16.3, 18.3, 19.6, 20.9, 26.1, 29.7, 33.8, 43.9, 46.5, 53.4, 55.4, 129.7, 131.3, 210.8, 214.0

考 察

ウコンの精油の組成から考察すると、その多くはメバロン酸経路で生合成されるモノテルペンや

セスキテルペンで構成されているということが明らかとなった。

また単離した化合物には、顕著なSOD活性がみられなかったが、チロシナーゼ阻害活性については、現在化粧品添加剤として広く使用されているArbutinと同等の活性がみられた。

抗微生物活性は細菌類で強く認められるが、糸状菌や酵母では活性が低下した。また、単離成分のうちNeocurdioneにくらべCurcumolでは活性が低下傾向にあった。またこれら単離精油成分はウコンの精油の活性とほぼ同程度であることからこの両成分がウコン精油の抗微生物活性の本体であると考えられる。

*Micrococcus luteus*と*Pseudomonas aeruginosa*に関して、Neocurdioneにおけるマイクロプレート法での抗菌活性が高く、また、*Escherichia coli*に関してCurcumolにおけるマイクロプレート法での抗菌活性が高くなっている。ペーパーディスク法における阻止帯の大きさは、精油が拡散し易ければ大きく、拡散しにくければ小さくなるということから拡散しにくい化合物であると考えられる。

以上のことから春ウコン葉部には、高い抗微生物活性とチロシナーゼ阻害活性がみられ、さまざまな機能性があることが明らかとなった。

- 7) 西村民男：誰でもわかる抗菌の基礎知識、159-163 (1999)
- 8) Hisashi M., Toshio M., Kiyofumi N. and Masayuki Y.: *Tetrahedron*, 57, 8443-8453 (2001)
- 9) Takeshi H., Masaaki O. and Masanori K.: *Phytochemistry*, 44 (4), 627-632 (1997)

引用文献

- 1) 野呂征男：生薬学改訂第5版 99.100 (2002)
- 2) Pandji, C., Grimm, C., Wray, V., Witte, L., and Proksh, P., 1993. *Phytochemistry*, 34, 415-419 (1993)
- 3) Ahmad, F. B., Mackeen, M. M., Ali, A. M., Mashirun, S. R., and Yaacob, M. M., *Insect Sci. Applic.* 16, 391-393. (1995)
- 4) 花田寿郎、茂手木皓喜：臨床検査機器、試薬、8, 629 (1985)
- 5) McCord, J. M. and Fridovich, L. : *J. Biol. Chem.*, 244, 6049 (1969)
- 6) Masaki, H., : *FRAGRANCE JOURNAL*, 8, 65 (1995)