

## 一般的な生薬からのポリフェノール類の単離と その生理活性について

野村 正人<sup>†1</sup>, 石井 まや<sup>†2</sup>, 元矢 知志<sup>†3</sup>, 井上 俊夫<sup>†4</sup>

### Isolation of Polyphenols from General of Herbal Medicines and Their Physiological Activities

Masato NOMURA<sup>†1</sup>, Maya ISHII<sup>†2</sup>, Tomoshi MOTOYA<sup>†3</sup> and Toshio INOUE<sup>†4</sup>

#### Abstract

Medicinal plants, which are attracting attention from the preventive care that is different from Western medicine, contain various active ingredients; and some of them are used as common herbal medicine. It was found that Gentiopicroside, Swertiamarin, Magnolol, and Honokiol contained in the experimental samples, *Gentiana lutea*, *Swertia japonica*, and *Magnolia obovate*, were able to be isolated and purified by simple methods such as column chromatography. In addition, antioxidant potency test (DPPH radical scavenging effect and inhibitory effect against active oxygen), experiments on the control of histamine release, cellular characteristic test, and antibacterial activity test were conducted for the expressions of physiological activities of these compounds. As a result, new findings were confirmed from each test result.

**Keywords:** Gentiopicroside, Swertiamarin, Magnolol, Honokiol, *Gentiana lutea*, *Swertia japonica*, *Magnolia obovate*, physiological activities.

#### 1. 緒言

健康で健やかな生活を営むことは誰しもが追い求める理想の一つである。高齢化社会の到来とともに癌や脳卒中などの生活習慣病やそれに準ずる様々な疾患が急激に増加し社会問題となっている。そこで、これらを予防するため、西洋医学とは異なる予防的観点から注目される生薬および薬用植物をはじめとする漢方<sup>1-3)</sup>などの医薬品の需要が高くなっている。生薬は薬品や製薬の原料として用いられる動植物や鉱物など天然物のことを指し、多種類であり、なかでも植物由来のものが最も多く存在<sup>4,5)</sup>している。しかし、未だ十分に研究が行われているとは言えない。本研究では健胃薬や整腸薬などとして有効なゲンチアナ(*Gentiana Radix*), センブリ(*Swertiae Harba*), およびコウボク(*Magnoliae Cortex*)の3種類の生薬から得られる4種類の化合物(Gentiopicroside, Swertiamarin, Magnolol, および Honokiol)についての好効率かつ、簡便な分離操作ならびに新たな生理活性に対する研究を行った。まず、ゲンチアナ(*Gentiana lutea*)はリンドウ目リンドウ科の多年生草本であり、ヨーロッパ中南部の山地に自生している。近年では北海道で栽培化が進められ

ている。生薬としては根、および根茎が用いられ、秋には地上部が枯れる頃に根と根茎を掘り取り水洗いして天日で乾燥する。この生薬に含まれる Gentiopicroside は苦味配糖体の一種で、胃液の分泌を亢進させる働きがあり、胃および腸管運動促進作用もあることが知られている。この物質が関与して、ゲンチアナは重曹散として胃酸過多症に用いられ、また苦味健胃薬として西洋では古来より家庭薬として使用されている。現在でも配合剤として使用されているのが現状である<sup>6,7)</sup>。

つぎに、センブリ(*Swertia japonica*)はリンドウ目リンドウ科の二年生草本であり、日本では北海道から九州の日当たりの良い草原や疎林地に自生している。生薬としては全草が用いられ、開花期に採取し、よく乾燥後風通しの良い場所に遮光して保存する。この全草に含まれる Swertiamarin は苦味配糖体の一種であり、唾液、胆汁、および膵液の分泌を増加させる働きがある。この物質が関与して、センブリは苦味健胃薬や整腸薬として用いられ、ドクダミやゲンノショウコとならんで広く用いられている民間薬であり、最近では育毛剤に配合されること

<sup>†1</sup> 近畿大学名誉教授

<sup>†2</sup> 近畿大学システム工学研究科

<sup>†3</sup> 島根大学大学院医学系研究科医科学専攻(博士課程)

<sup>†4</sup> 日本薬科大学

Professor Emeritus of kindai University

Graduate School of Systems Engineering, kindai University

Graduate School of Medical University, Research, Shimane  
Doctor's Course in Medical Research

Pharmaceutical and Medical Business Sciences, Nihon  
Pharmaceutical University

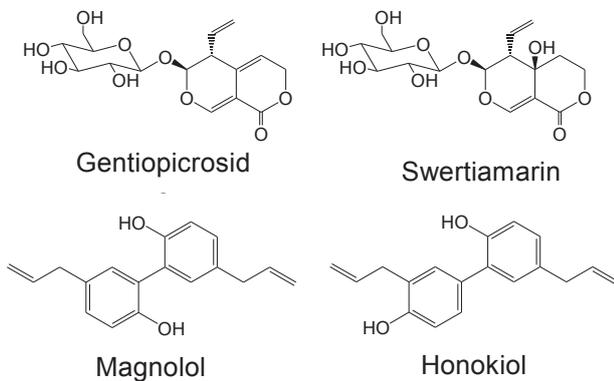


Fig.1 Chemical Structures of Main Compounds

もある<sup>6),8)</sup>。コウボクはモクレン目モクレン科の落葉高木であるホウノキ (*Magnolia obovata*) の樹皮のことを指し、北海道から九州に至る全国各地に自生している。生薬としては7月下旬頃に採取した幹と枝の皮をはぎ取り天日乾燥する。この生薬に含まれる Honokiol と Magnolol は中枢性筋弛緩作用や抗潰瘍作用、胃液分泌抑制作用などの働きがある以外に筋肉の痙攣、硬直の緩和生薬として用いられている<sup>6),9)</sup>。そこで今回、著者らはこれらの主要成分に対して簡便な抽出方法を検索し、単離・精製した化合物の抗酸化能発現として、DPPH ラジカル消去効果試験、および活性酸素阻害試験 (SOD) の抗酸化試験を行ない、また、ヒスタミン遊離抑制試験、細胞毒性試験、および抗菌活性試験を実施し、新たな知見を見いだすことができたので報告する。

## 2. 実験

### 2.1. 実験材料

実試料として用いたゲンチアナ、センブリ、およびコウボクの粉末は(株) 栃本天海堂から入手した。それぞれの生薬粉末 500g をメタノール 2 L に室温 (20±3°C) で暗所に 20 日間浸漬した後、濾別してメタノール溶媒を留去し、それぞれの粗抽出油分 (Fig. 2~4) を得た。

### 2.2. 機器分析

#### 2.2.1. GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) 分析

生薬から単離した化合物は GC-MS 分析 (島津製作所 (製); ガスクロマトグラフィー GC-17A, マススペクトルメーター QP-5000) を使用し分析を行なった。分析条件は Column : TC-1 (φ 0.25mm×30m i. d., GL Science 社製), Column Temp. : 50°C (5min Hold] ~ 240°C (3°C/min)], Injection Temp. : 240°C, Interface Temp. 230°C, Carrier Gas : He, Flow Rate : 2.0mL/min で測定した。

#### 2.2.2. GC (Gass Chromatgraphy) 分析

単離した化合物の分析は GC 装置 (島津製作所製 ガスクロマトグラフィー GC-14B を使用して、Magnolol, および Honokiol を市販品と同定した。分析条件として Column は DB-5 (φ 0.25mm×30m i. d., (J&W Scientific Inc. 製)) を使用して、Column Temp. : 200°C (3min Hold] ~ 230°C (3°C/min), Injection Temp. : 240°C, Detection Temp. : 250°C, Carrier Gas : He, Carrier Gas Pressure : 180 kPa で測定した。

#### 2.2.3. NMR 測定 (<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR)

単離した化合物の構造については、重クロロホルム溶媒 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 製)、または重メタノール溶媒 (関東化学 (社) 製) を用いて、<sup>1</sup>H-, および <sup>13</sup>C-NMR (JNM-EX400WB 型 FT, 日本電子 (社) 製) を用いて測定し標品と同定した。

#### 2.2.4. ポストカラム誘導体化法<sup>10,11)</sup>

移動相にはメタノール、および 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (0.017%; w/v) を含む 100mM リン酸二水素カリウムの混合液 (1 : 9 ; v/v) を用い、反応試薬には 0.008% (w/v) OPA, および 500mM 炭酸カリウム溶液を用いた。測定は移動相ポンプ (Intelligent Pump 505), 反応液ポンプ (EHA-505 reaction pump), および 12mL flow cell を装着した蛍光検出器 (FL Detector GL-7453A, GL Science (社) 製) から構成された Eicom HPLC system を用いて分析を行なった。分離カラムには Eicompak SC-150DS (φ 2.1mm×150mm i. d.; particle size 5 μm, Eicom Co. 製) を使用し、移動相とポストカラム試薬の流速はそれぞれ 0.3, および 0.1mL/min とした。ポストカラムの反応はカラムオープン (45°C ; Column oven 505, Eicom Co. 製) に収容された反応コイル (φ 0.25mm×9m i. d., PTFE) で行なった。反応後のサンプルは蛍光検出器により励起波長 340nm, 測定波長 450nm の条件で測定した。

## 2.3. 主要成分の単離方法

### 2.3.1. Gentiopicroside の単離方法

ゲンチアナ粉末をメタノール溶液で浸漬抽出し、濾別、濃縮して得られたメタノール粗抽出油を酢酸エチル溶媒で分画を行なった。つぎに DIAION® HP-20 を充填剤として、水 : メタノール混合溶媒 (7 : 3), (1 : 1), (3 : 7), およびアセトンの順にグラジエント溶出でオープンカラムクロマトグラフィーを行ない Fr.1~4 に分画した。その後、Fr.1 を水 : メタノール混合溶媒 (7 : 3) を展開溶媒とした逆相系薄層クロマトグラフィー (RP-8) を用いて、ゲンチアナの主要成分である Gentiopicroside (標品と同定 (Extrasynthese (社) 製) を単離 (Fig.2) することができた。

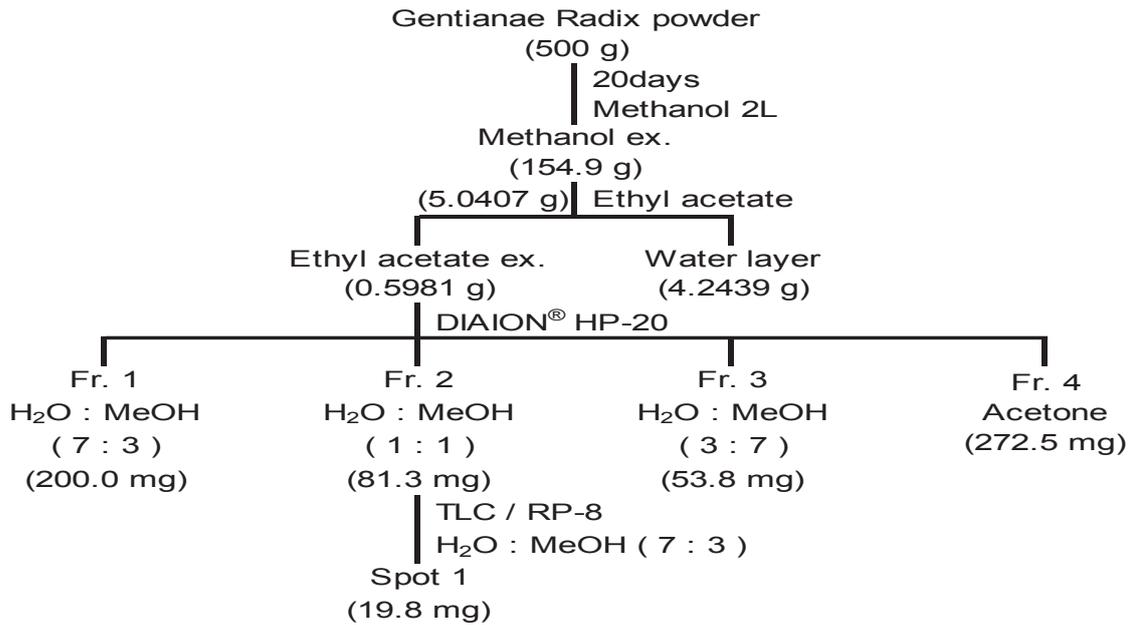


Fig.2 Separation of Gentianae Radix

### 2.3.2. Swertiamarinの単離方法

センブリ粉末をメタノール溶媒で浸漬抽出し、濾別、濃縮して得られたメタノール粗抽出油を *n*-ヘキサン、ジエチルエーテル、クロロホルム、および酢酸エチルの順に分画を行なった。つぎに、酢酸エチル分画部について DIAION® HP-20 を用いて、水：メタノール混合溶媒(8：2)、(1：1)、(2：8)、およびアセトン溶媒の順にグラジエ

ント溶出でオープンカラムクロマトグラフィーを行ない Fr.1~4 に分画した。ついで、分画部 Fr.1 を水：メタノール混合溶媒(8：2)を展開溶媒とした逆相系薄層クロマトグラフィー(RP-8)を用いて、センブリの主要成分である Swertiamarin(標品と同定(和光純薬(社)製)を単離( Fig.3)することができた。

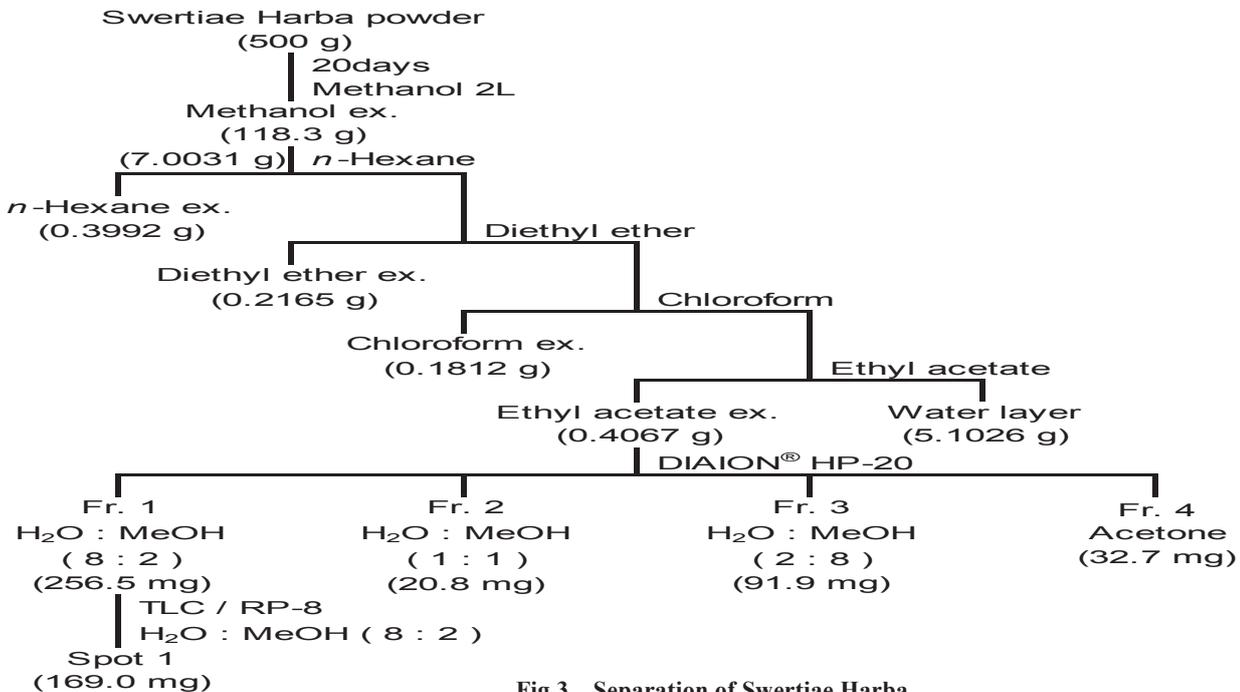


Fig.3 Separation of Swertiae Harba

2.3.3. Magnolol および Honokiol の単離方法

コウボク粉末をメタノール溶媒で浸漬抽出し、濾別、濃縮して得られたメタノール粗抽出油を Silica gel 60 を用いて、ジエチルエーテル:クロロホルム混合溶液(1:9)を展開溶媒としたガラス製オープンカラムクロマトグラフィーを行ない Fr. 1~3 に分画した。ついで、Fr. 2 をジエチルエーテル:クロロホルム溶媒(1:9)を展開溶媒とした順相系薄層クロマトグラフィー(Silica gel 60)を用いて、コウボクの主要成分である Magnolol(標品と同定(ナカライテスク(株)社製)と Honokiol(標品と同定(ナカライテスク(株)社製)をそれぞれ Spot 2 と Spot 1 として単離することができた。ついで、それぞれの主要成分を Gel permeation Chromatography (GPC) カラム(日本分析工業(社)製)を用いて、リサイクル分取液体クロマトグラフィー(LC-908 型:日本分析工業(社)製)を用いて精製(Fig. 3)した。

に静置した後、マイクロプレートリーダー(MTP-300 型:コロナ電気(社)製)を用いて 517nm の吸光度で測定した。ブランク試験として試料溶液の代わりにエタノール溶液 100 $\mu$ L を加えた。また、色対照試験として 0.2mM DPPH エタノール溶液の代わりにエタノール溶液 50 $\mu$ L を加えて同様の操作で測定した。本試験の吸光度を A, ブランク試験の吸光度を B, 色対照試験の吸光度を C とし、次式を用いて DPPH ラジカル消去率を算出した。また、各検体の各濃度における DPPH ラジカル消去率について 50%消去濃度 SC<sub>50</sub> を算出した。

$$\text{DPPH ラジカル消去効果試験(\%)} = \left( 1 - \frac{A-B}{C} \right) \times 100$$

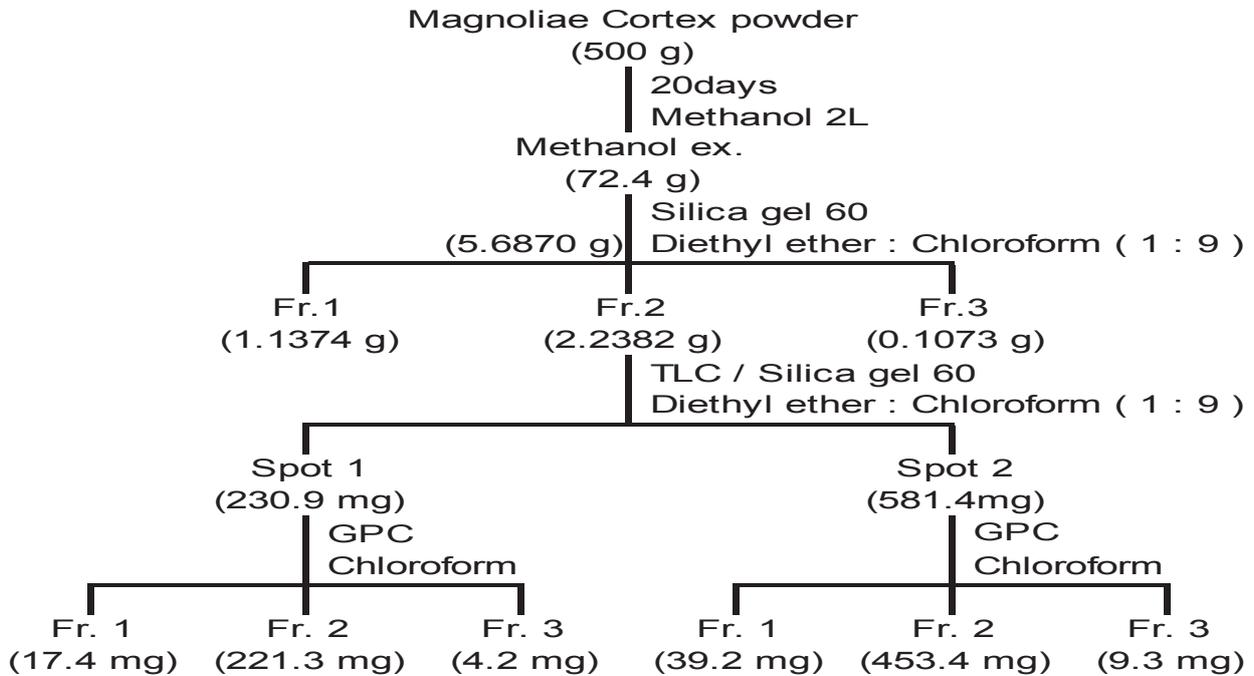


Fig. 4 Separation of Magnoliae Cortex

2.4.生理活性試験

2.4.1.DPPH ラジカル消去効果試験<sup>12,13)</sup>

試料溶液はエタノールを用いて 1.0mg/mL に調整した。指標となる  $\alpha$ -トコフェロール(東京化成工業(株)製)も同様の操作により 0.1mM に調整した。また、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(以下, DPPH と略す;東京化成(株)製)もエタノールを用いて 0.2mM に試験当日に調整し、実験に使用するまで冷暗所に保存した。本試験は  $\alpha$ -トコフェロール、および各調製試料溶液を用いて 96 穴マイクロプレートに 8 段階の 2 倍希釈系列 100 $\mu$ L を 2 系統作成した。この希釈系列にエタノール溶液 100 $\mu$ L を加え、さらに 0.2mM DPPH エタノール混合溶液 50 $\mu$ L を加え攪拌した。このマイクロプレートを 30 分間室温で暗所

2.4.2.活性酸素阻害試験 (SOD)<sup>14)</sup>

活性酸素阻害試験は SOD 活性検出キット(和光純薬(株)製)を使用した。試料溶液は DMSO を用いて 1.0mg/mL に調整した。指標となる L(+)-アスコルビン酸(関東化学(株)製)も同様の操作により 0.1mg/mL に調整した。反応停止液はあらかじめ 37 $^{\circ}$ C の恒温槽に入れ融解させておいた。本試験は 96 穴マイクロプレートに、まず L(+)-アスコルビン酸と各試料溶液 10 $\mu$ L を加え、次に発色試薬 100 $\mu$ L 加えて 1 分間攪拌した後、酵素液 100 $\mu$ L を加えた。さらに 1 分間攪拌し、37 $^{\circ}$ C の恒温槽の中で 28 分間静置させた。その後、恒温槽から反応停止液と同時に取り出し反応停止液 20 $\mu$ L を加えた。5 分間攪拌しマイク

ロプレートリーダーを用いて 560nm の吸光度で測定した。ブランク試験として、酵素液の代わりにブランク液 100  $\mu$ L を加え、同様の操作で測定した。色対照試験として試料溶液の代わりに DMSO 10  $\mu$ L を加え、同様の操作で測定した。色対照のブランク試験として、試料溶液の代わりに DMSO 溶液 10  $\mu$ L、酵素液の代わりにブランク液 100  $\mu$ L を加え、同様の操作で測定した。本試験の吸光度を A、ブランク試験の吸光度を B、色対照試験の吸光度を C、色対照のブランク試験の吸光度を D とし、次式を用いて活性酸素阻害率を算出した。

$$\text{SOD 活性値 (\%)} = \left( 1 - \frac{A - B}{C - D} \right) \times 100$$

#### 2.4.3. ヒスタミン遊離抑制作用試験<sup>15)</sup>

Wister 系雄性ラット (14-17 週齢, (株) 埼玉実験動物供給所) を用い、室温 24 $\pm$ 2  $^{\circ}$ C, 湿度 55 $\pm$ 15% の動物室で飼育した。飼料, および飲料水は自由に摂取させた。試料溶液は DMSO を用いて 20mmol/mL に調整し、実験に使用するまで -60 $^{\circ}$ C で保存した。まず, ラット腹腔マスト細胞の単離を行なった。Wister 系雄性ラットを断頭, 放血致死させ, PPS(-) (NaCl 154, KCl 2.7, CaCl<sub>2</sub> 5, N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンサルホン酸 (HEPES) 5mM ; pH7.4) を 15mL 腹腔内に注入し, 90 秒間穏やかにマッサージをした後, 腹部を正中切開して腹腔内液を回収した。PSS(-) 10mL で腹腔内をさらに 60 秒間洗浄し, その洗浄液を先に得られた腹腔内液と合わせ, 4  $^{\circ}$ C, 100 $\times$ g の条件で 7 分間遠心分離を行ない, 得られた沈渣を生理的塩溶液 PSS(-) で 1 回洗浄した。次に Percoll 密度勾配遠心法により, マスト細胞の単離を行なった。細胞浮遊液に 90% Percoll 3mL を加えて静かに転倒混和した後, PSS(-) 1mL を重層して 4 $^{\circ}$ C, 200 $\times$ g で 15 分間遠心分離した。得られた沈渣を PSS(-) で 2 回洗浄し, 2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mL となるように PSS(+) (0.1% glucose in PSS(-)) 中に浮遊させた。本試験は 96 穴マイクロプレートに PSS(+) 210  $\mu$ L と細胞浮遊液 30  $\mu$ L 入れた後, 37  $^{\circ}$ C の恒温槽で 15 分間インキュベートした。つぎに, PSS(+) に溶解した各濃度の被検薬物 30  $\mu$ L を添加して 37 $^{\circ}$ C で 10 分間放置した。ついで, PSS(+) に溶解した compound 48/80 (Sigma-Aldrich 社製) の最終濃度が 0.5  $\mu$ g/mL の溶液 30  $\mu$ L を加え, 10 分後に氷冷し反応を停止した。得られた反応液を 4 $^{\circ}$ C, 200 $\times$ g で 15 分間遠心分離し上清 150  $\mu$ L を分取した。分取した上清と沈停止渣にそれぞれ等量の 0.8N Perchloric acid (PCA) を加え, 0.4N PCA で 100 倍に希釈した試料をヒスタミン定量用試料とし, 測定まで -60 $^{\circ}$ C で保存した。得られた上清, および沈渣のヒスタミン含量の測定は OPA を用いたポストカラム法で行なった。

#### 2.4.4. 細胞毒性試験<sup>16)</sup>

使用した細胞はヒト由来肺胞上皮細胞 A549 (ATCC :

American Type Cell Culture) を用いた。また, 細胞培養の FBS (Fetal bovine serum (以下, FBS と略す), GIBCO 社製), Dulbeccos Modified Eagle Medium (以下, DMEM と略す), GIBCO 社製) 培地はいずれも市販品 (GIBCO 社製) のもので非働化したものを用いた。A549 細胞の継代培養は, サブコンフルエントに達した細胞の培養フラスコから培地を吸引除去し, 細胞を PBS (-) (Phosphate Buffer Saline は GIBCO 社製) 2mL で 2 回洗浄後, 0.05% トリプシン-EDTA 溶液 (GIBCO 社製) 2mL を加え, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下, 37 $^{\circ}$ C で約 3~5 分間インキュベートした。フラスコから細胞を剥離した後, 細胞液をポンピングし, 等量の培地を加えてトリプトシンの反応を停止させた。次に, 剥離した細胞懸濁液を遠心チューブに移し, 200 $\times$ g, 5 分間, 室温の条件で遠心操作して細胞を回収した。ついで, 上清を取り除き, それぞれ培地 1mL を加えて懸濁し, トリプンブルーにて生細胞数を計測し, それぞれ 10% FBS 含有 DMEM 培地で継代培養を行なった。これを 3~4 日ごとに操作を行なった。本試験は継代培養後のサブコンフルエント状態の細胞を細胞培養用 96 ウェルプレートにウェルあたり 2000 個/100  $\mu$ L 濃度で蒔きこみ, 一晚インキュベートして細胞をウェルに付着させた。細胞の張り付きを確認後, 培地を除去し, 所定濃度 (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, および 100  $\mu$ M) の被験物質を添加して調整した 10% FBS 含有 DMEM 培地溶液をそれぞれ 100  $\mu$ L 添加し, さらに 24 時間培養した。その後, 30 分間室温にて放置して, 生細胞測定用 Cell Titer-Glo Luminescence 試薬を 100  $\mu$ L 添加し, 2 分間振とうして細胞内の ATP と反応させ, ルミノメーターで発色を測定して生細胞数を算出した。

#### 2.4.5. 抗菌活性試験<sup>17)</sup>

単離した Gentiopicroside (5.6mg), および Swertiamarin (14.9mg) に滅菌水 1mL, Magnolol (10.0mg), および Honokiol (10.0mg) に DMSO 1mL (1.08 g) を添加後, 攪拌し温度 45~50  $^{\circ}$ C で溶解させたものを試験液とした。供試菌株はグラム陽性菌として枯草菌 (*Bacillus subtilis* ATCC6633), および黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC6538), グラム陰性菌として大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC8739), および緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027) を使用し, 菌液 50  $\mu$ L (10<sup>5</sup> 個/50  $\mu$ L) を平面塗抹した。使用培地はいずれも日本製薬株式会社製のものを用い, 枯草菌では標準寒天培地, 黄色ブドウ球菌ではマンニト食塩培地, 大腸菌ではデゾキシコレート寒天培地, 緑膿菌では NAC 寒天培地を使用した。本試験はペーパーディスク法 ( $\phi$  8cm 濾紙) を用いて行なった。まず, 試験液をディスクに所定量 (0  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, および 60  $\mu$ L) 滴下し, 35 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。その後, ディスクの内径を除いた育成阻止円を求め抗菌活性を評価した。なお, Magnolol, および Honokiol に添加した DMSO については 50  $\mu$ L をディスクに滴下し, 無添加のコントロールと比較して抗菌活性

の発現が認められないことを確認した。

## 2.5. NMR 解析

単離した化合物(2-5-1~2-5-4 の項)の構造については<sup>1</sup>H-, および<sup>13</sup>C-NMR を測定し、文献<sup>16)</sup>ならびに標品(東京化成工業(株)製)との比較同定により決定した。

### 2.5.1. Gentiopicroside の NMR 測定

<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD) : δ (ppm) 3.12 (1H, dd, *J* = 8.1 and 7.8 Hz, CH), 3.21 (1H, t, *J* = 8.8 Hz, CH), 3.30-3.37 (2H, m, CH), 3.53 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, CH), 3.62 (1H, dd, *J* = 6.3 Hz, -CH<sub>2</sub>OH), 3.88 (1H, dd, *J* = 2.0 Hz, -CH<sub>2</sub>OH), 4.63 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, CH), 4.90-5.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 5.19 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, -CH=CH<sub>2</sub>), 5.22 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, -CH=CH<sub>2</sub>), 5.61 (1H, m, CH), 5.66 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, CH), 5.71 (1H, ddd, *J* = 6.8 Hz, -CH=CH<sub>2</sub>), 7.45 (1H, s, CH).

<sup>13</sup>C-NMR(CD<sub>3</sub>OD) : δ (ppm) 46.6, 62.7, 70.9, 71.5, 74.5, 77.9, 78.4, 98.4, 100.1, 104.9, 117.1, 118.4, 126.9, 134.9, 150.5, 166.1.

### 2.5.2. Swertiamarin<sup>18)</sup> の NMR 測定

<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD) : δ (ppm) 1.87-1.95 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.94 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, CH), 3.53 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, CH), 3.65 (1H, dd, *J* = 5.6 and 5.9 Hz, -CH<sub>2</sub>OH), 3.87 (1H, dd, *J* = 2.0 Hz, -CH<sub>2</sub>OH), 4.33-4.36 (1H, m, CH<sub>2</sub>), 4.73-4.78 (1H, m, CH<sub>2</sub>), 4.63 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, CH), 5.28-5.72 (3H, m, -CH=CH<sub>2</sub>), 5.72 (1H, s, CH), 7.64 (1H, s, CH).

<sup>13</sup>C-NMR(CD<sub>3</sub>OD) : δ (ppm) 33.7, 51.9, 62.5, 64.2, 65.9, 71.3, 74.4, 77.7, 78.4, 99.0, 100.2, 108.7, 121.1, 133.7, 154.7, 167.8.

### 2.5.3. Magnolol の NMR 測定

<sup>1</sup>H-NMR(CDC<sub>13</sub>) : δ (ppm) 3.36 (4H, d, *J* = 6.6 Hz, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.06-5.11 (4H, m, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.41 (2H, s, Ph-OH), 5.91-6.01 (2H, m, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 6.95 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, Ph-H), 7.08 (2H, s, Ph-H), 7.13 (2H, d, *J* = 2.2 Hz, Ph-H).

<sup>13</sup>C-NMR(CDC<sub>13</sub>) : δ (ppm) 39.3, 115.7, 116.5, 123.3, 129.9, 131.0, 133.0, 137.3, 151.0.

### 2.5.4. Honokiol<sup>19)</sup> の NMR 測定

<sup>1</sup>H-NMR(CDC<sub>13</sub>) : δ (ppm) 3.34 (2H, d, *J* = 5.9 Hz, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3.46 (2H, d, *J* = 5.6 Hz, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.04-5.24 (4H, m, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.07 (2H, br s, Ph-OH), 5.94 (2H, m, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 6.89 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, Ph-H), 6.93 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, Ph-H), 7.02 (1H, t, *J* = 8.1 Hz, Ph-H), 7.21-7.26 (4H, m, Ph-H).

<sup>13</sup>C-NMR(CDC<sub>13</sub>) : δ (ppm) 35.2, 39.4, 115.4, 116.5, 116.9, 126.1, 127.5, 128.4, 128.7, 129.4, 130.0, 131.0, 132.0, 135.8, 137.6, 150.6, 153.8.

## 3. 結果および考察

### 3.1. 抗酸化能試験について

各生薬粉末をメタノール浸漬後に抽出、濃縮後に得られた油分に対し、DPPH ラジカル消去効果試験、および活性酸素阻害試験(SOD)を行なった結果、センブリとコウボクに高いDPPH ラジカル消去効果があることを確認した。つぎに、単離した4種類の化合物に対し同様の抗酸化能試験を行なった結果、Honokiol に高いDPPH ラジカル消去効果を発現することが確認できた。このことから、コウボクの油分に認められた高い抗酸化活性は Honokiol が関与しているものと考えられる (Table-1)。また、DPPH ラジカル消去効果は DPPH ラジカル内に存在する窒素に水素が結合しラジカル消去が行われ、その時の色の变化を観ている。このラジカル消去効果には α-トコフェロールなどのフェノール類が高い効果を発現しており、Honokiol も2つの水酸基を持つフェノール類であることから同様の効果が発現した物と考えられる。また、食品中の脂質酸化は一般的にはフリーラジカルを中間体とする自動酸化反応により進行していることが考えられている<sup>20-23)</sup>。自動酸化において、アルキルラジカル(L•)が空気中の酸素と結合してペルオキシラジカル(LOO•)となる。このペルオキシラジカルは新たな脂質分子の水素と反応してヒドロペルオキシド(LOOH)となるのと同時に、新たな脂質ラジカルが生成し、この反応が連鎖的に起こりラジカル阻止型の抗酸化剤はペルオキシラジカルに水素を反応させることにより脂質酸化の連鎖反応を阻止している。このように脂質酸化の反応機構による抗酸化剤としては天然抗酸化剤である α-トコフェロールが汎用性が広く使用されている<sup>24,25)</sup>。これらの考察から Honokiol は α-トコフェロールと同様にラジカル阻止型の抗酸化剤として利用できることが期待される。一方、Honokiol が高い抗酸化活性を発現したのに対し、

Honokiol の構造異性体である Magnolol は Honokiol ほどの抗酸化活性の発現は認められなかった。活性発現の強弱については、構造を形成している B 環のベンゼン環上に存在する水酸基に注目したところ、Honokiol では 4' 位に水酸基が存在するのに対し、Magnolol では 2' 位に水酸基が位置している以外、同じ構造を有していること

から、B 環のベンゼン環上に存在する水酸基の位置の相違により、抗酸化活性発現の強弱に関与しているものと考察した。

**Table-1 Antioxidant Activity Assay**

Sample <sup>a)</sup>	DPPH Radical Scavenging Assay		SOD-like Activity Assay
	Scavenging Rate (%) <sup>b)</sup>	SC <sub>50</sub> <sup>c)</sup>	Inhibition Rate (%)
Gentianae Radix (MeOH ex.)	38.0	>400	8.6
Swertiae Herba (MeOH ex.)	92.4	49.6	20.0
Magnoliae Cortex (MeOH ex.)	93.1	14.7	39.8
Gentiopicroside	13.9	>400	26.4
Swertiamarin	0.5	>400	13.5
Magnolol	76.5	88.3	22.8
Honokiol	94.1	12.0	20.5
$\alpha$ -Tocopherol <sup>d)</sup>	94.4	8.1	—
Ascorbic acid <sup>e)</sup>	—	—	7.5

a) Concentration : 1.0 mg / mL. b) Final Concentration : 0.4 mg / mL. c) 50% Scavenging Concentration (  $\mu$ g / mL ).  
d) Concentration : 0.1 mM. e) Concentration : 0.1 mg / mL.

### 3.2. ヒスタミン遊離抑制試験について

近年、生活環境の変化による花粉症や食物などによるアレルギー発症が増加している。生薬として古くから用いられてきた今回の生薬中の主要成分にアレルギー反応を抑える効果 <sup>26)</sup> があるか否かを明らかにするために、4 種類の主要成分に対してのヒスタミン遊離抑制試験を行った。今回ラット腹腔マスト細胞を用いて、マスト細胞の脱顆粒を引き起こすことが知られている塩基性ポリマーである Compound 48/80 (かゆみ誘発剤) を添加して、ヒスタミン遊離を生起させる方法によりヒスタミンの抑制効果の発現について検討した。その結果を Table-2 に示す。配糖体である Gentiopicroside, および Swertiamarin にコントロールよりも低い値が得られたが、Magnolol, および Honokiol についてはコントロールよりも高い値を確認した (Fig. 5)。すでに、抗ヒスタミン剤として研究され利用されている化合物としてケルセチンがある。その構造の特徴は 3 つの A, B および C 環からなり、ヒスタミン遊離抑制への作用は芳香環上に存在する水酸基が抑制効果に関与していると考えられている。特にケルセチンの B 環構造上のカテコール構造における抗酸化反応は、3', 4' 位の水酸基が反応してキノン構造に変化することで生起 <sup>26, 27)</sup> するものと考えられている。また、ベンゼン環上に *m*-配位で水酸基が結合しているこ

ともヒスタミン遊離抑制効果に関与していると考えられている。これらのことから、Swertiamarin の水酸基が関与してキノン構造を形成し、コントロールと比較して僅かながらヒスタミン遊離抑制効果が発現したものと考察した。

**Table-2 Anti-allergic Activity Assay of Main Compounds**

Compound (100 $\mu$ M / mL)	Histamine Release (%)
Control	18.78 $\pm$ 0.65
Gentiopicroside	16.42 $\pm$ 2.46
Swertiamarin	15.92 $\pm$ 1.66
Magnolol	27.02 $\pm$ 1.63
Honokiol	26.64 $\pm$ 1.69 *

\* p < 0.05 compared with the control group ( Dunnett's test ) n=5-9

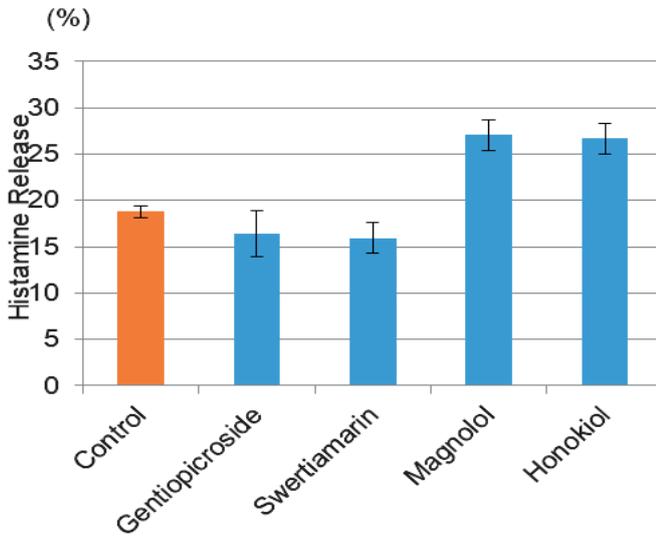


Fig. 5 Effect of Anti-allergic Activity Assay

### 3.3. 細胞毒性試験について

単離した4種類の化合物について、細胞への影響を検討するためにヒト由来肺胞上皮細胞株 A549 を用いて免疫蛍光法による細胞毒性試験を行なった。その結果をTable-3に示す。Magnololについては濃度が高くなるにつれて細胞生存率が下がる傾向が認められたが、100 μMの濃度に限定すると、いずれの化合物も細胞生存率が80%以上という値を示したことから、毒性は認められないものと判断した (Fig. 6)。

Table-3 Cell Toxicity Assay of Main Compounds

Concentration (μM)	% of Control			
	Cell Toxicity			
	Gentiopicroside	Swertiamarin	Magnolol	Honokiol
1	101.4	101.8	96.7	110.2
10	103.6	106.9	92.5	109.7
100	94.0	103.4	88.1	116.8

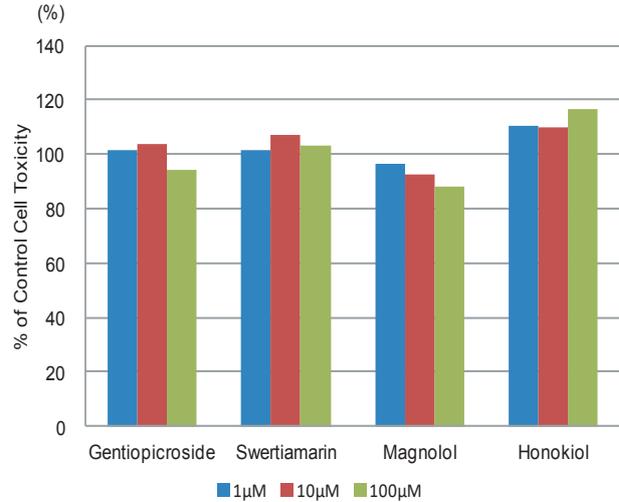


Fig. 6 Effect of Cell Toxicity Assay

### 3.4. 抗菌活性試験について

抗菌剤としての効果を確認するために単離した4種類の成分に対する抗菌活性試験を行なった。その結果、Gentiopicroside、および Swertiamarin はいずれの菌に対しても抗菌活性は認められなかった (Fig. 7, 8)。一方、Magnolol については枯草菌に対して 20 μL, 40 μL, および 60 μL の滴下量で、それぞれ阻止円 1mm, 3.5mm, および 6mm と抗菌剤としての効果が認められた。また、黄色ブドウ球菌に対しても濃度により 2.5mm, 6mm, および 8.5mm の阻止円が認められ、抗菌剤としての効果を確認した (Fig. 9)。Honokiol は枯草菌に対して 1mm, 3mm, および 4mm の阻止円が、黄色ブドウ球菌に対しても 3.5mm, 5mm, および 6.5mm の阻止円を確認 (Fig. 10) することができた。これらの結果から Magnolol、および Honokiol にはグラム陽性菌に対する抗菌活性があることを明らかにすることができた。Magnolol、および Honokiol はネオリグナン構造<sup>28)</sup>を有しており、ネオリグナンには2個のフェニルプロパノイド(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)が8,8'-結合以外の位置で結合された構造を有する化合物<sup>29,30)</sup>である。そのネオリグナン類には殺菌作用があるとの報告もあることから、このような効果を発現したものと考えられる。また、ネオリグナン類として知られている Conocarpan, Eupomatenoid-5, および Eupomatenoid-6 は枯草菌、および黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性が発現することが Pessini らによって報告<sup>31)</sup>されている。また、これら3種類の化合物にはいずれもベンゼン環上に一つの水酸基が存在しており、これらをジアゾメタンでメチル化した化合物はいずれも抗菌活性の発現は認めらず、これらの結果から Magnolol、および Honokiol の抗菌活性にはネオリグナン構造とベンゼン環上の水酸基の存在が関与しているものと考察した。

#### 4. 結言

生薬のゲンチアナ、センブリ、およびコウボクの主要成分についての単離を行ない、生理活性評価として抗酸化活性、ヒスタミン遊離抑制効果、細胞毒性、および抗菌

活性について明らかにした。まず、それぞれの生薬粉末のメタノール抽出油分、および4種類の成分の抗酸化活性についてDPPHラジカル消去効果試験から、センブリとコウボクのメタノール抽出部、およびコウボクから単離

Fig.7 Antibacterial Activity Assay of Gentiopicroside

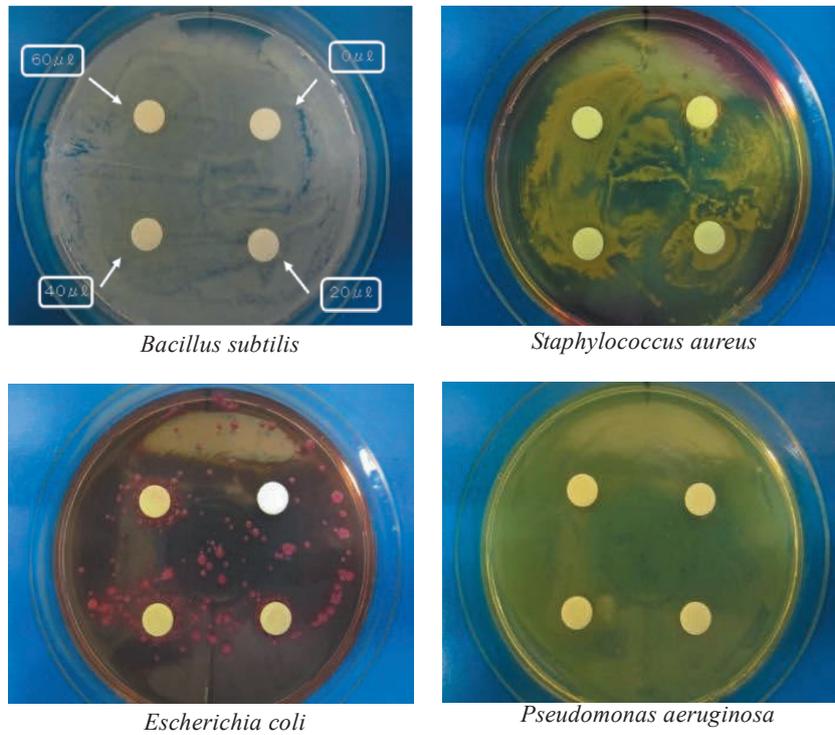


Fig. 8 Antibacterial Activity Assay of Swertiamarin

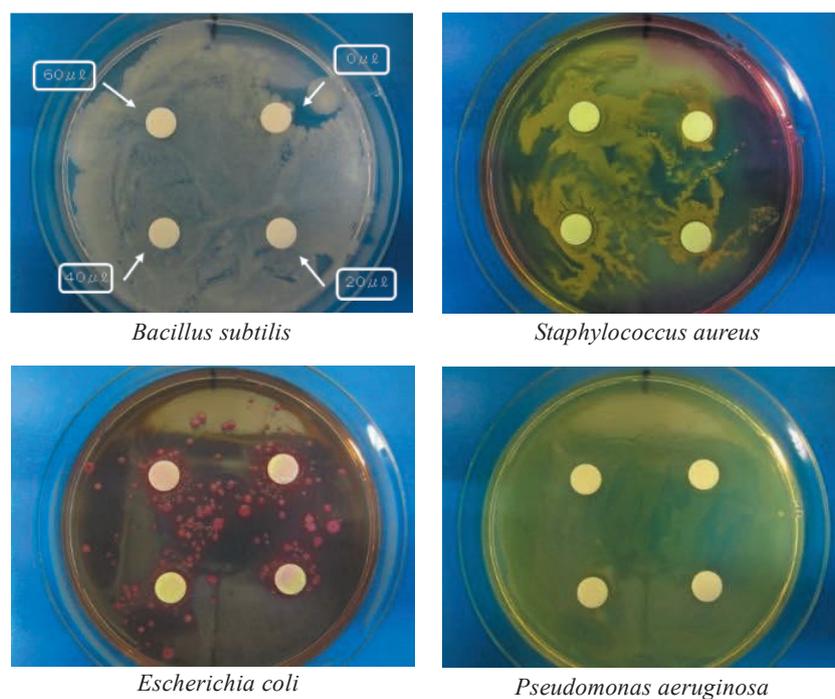


Fig.9 Antibacterial Activity Assay of Magnolol

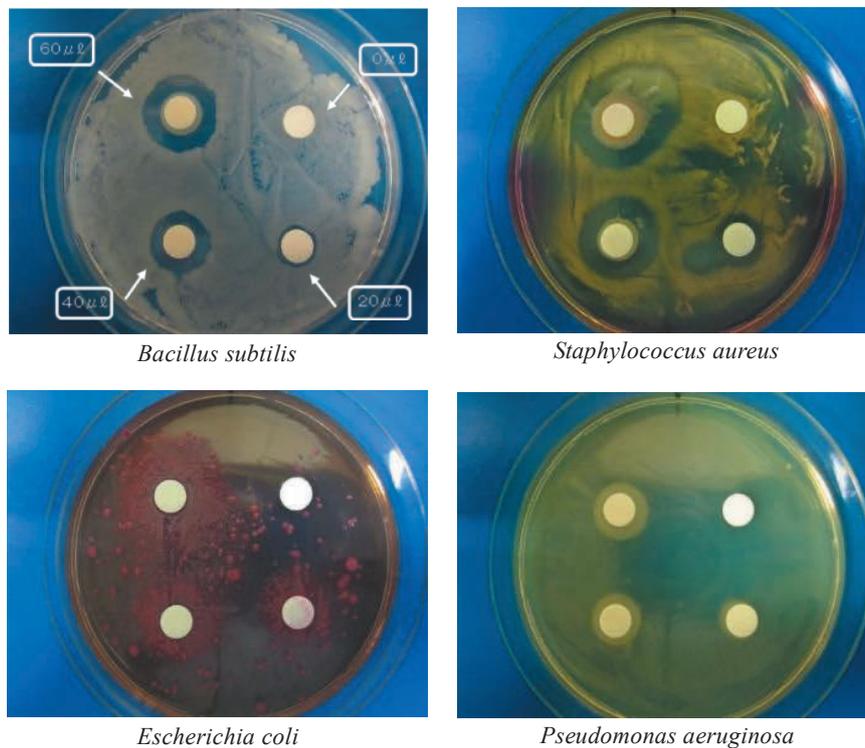
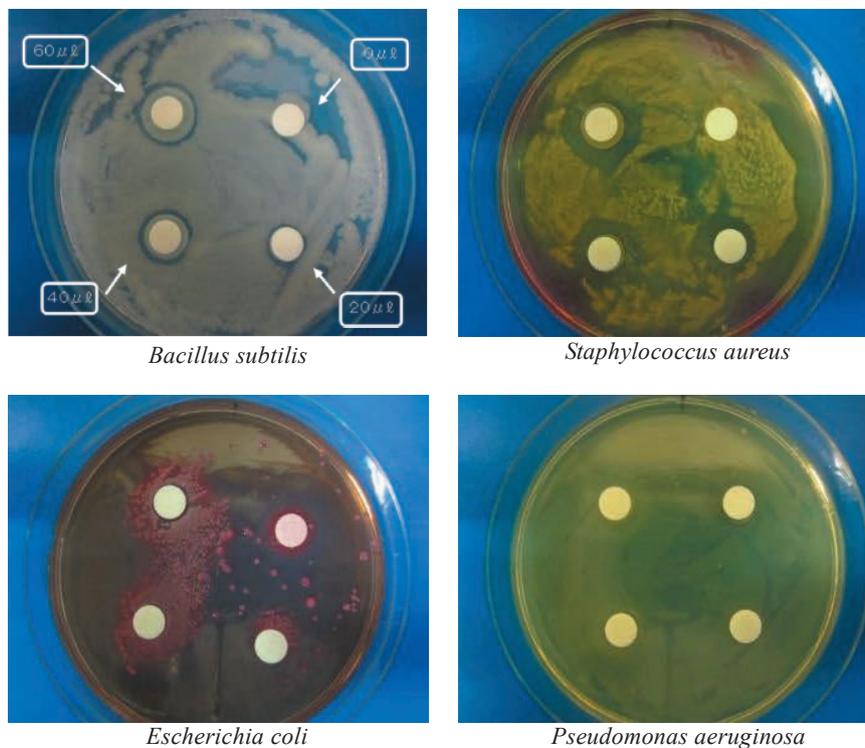


Fig. 10 Antibacterial Activity Assay of Honokiol



した Honokiol は  $\alpha$ -トコフェロールと同等 (0.1mM 濃度) のラジカル消去率があることを確認した。この結果から コウボク のメタノール抽出油の抗酸化活性発現には

Honokiol が関与しているものと判断した。食品中の脂質酸化においてラジカル阻止型の抗酸化剤はベンゼン環上の水酸基の水素を反応させることによって、脂質酸化の

連鎖反応を阻止する作用が働くことから、代表的な天然抗酸化剤である  $\alpha$ -トコフェロールと同様な DPPH ラジカル消去作用、および脂質酸化の反応機構が生起し抗酸化剤としての利用が期待できるものと考察した。一方、Honokiol が高い抗酸化活性を示したのに対し、Honokiol の構造異性体である Magnolol は Honokiol ほどの抗酸化活性の発現は認められなかった。活性発現の強弱については、B 環のベンゼン環上に存在する水酸基に注目したところ、Honokiol では 4' 位に水酸基が存在するのに対し、Magnolol では 2' 位に水酸基が存在している以外は同じ構造を有していることから、B 環のベンゼン環上に存在する水酸基の位置の相違により、抗酸化活性発現の強弱に関与しているものと考察した。今回単離した 4 種類の化合物に対して、ラット腹腔マスト細胞を用いたヒスタミン遊離抑制効果について明らかにした。その結果、Gentiopicroside、および Swertiamarin について僅かながらコントロールより低い値が認められたことから、Swertiamarin の水酸基がキノン構造に変化することにより、ヒスタミン遊離抑制効果<sup>32-34)</sup>が発現したものと考えられる。一方、Magnolol、および Honokiol に対してはコントロールより高い値が得られ、アレルギーを引き起こす可能性が示唆された。また、単離した 4 種類の化合物に対して、ヒト由来肺上皮細胞 A549 を用いた細胞毒性を行なった結果、Magnolol に関しては濃度依存性があり細胞生存率の低下が認められる一方、他の化合物は濃度 100 $\mu$ M において 80%以上の細胞生存率を示し毒性は認められなかった。さらに、単離した 4 種類の化合物に対してグラム陽性菌である枯草菌、および黄色ブドウ球菌、グラム陰性菌である大腸菌、および緑膿菌の抗菌活性を検討した結果、Magnolol、および Honokiol は枯草菌、および黄色ブドウ球菌に対して抗菌剤としての効果が認められた。その要因として、Magnolol と Honokiol の構造には殺菌作用効果で知られるネオリグナン構造があるため殺菌作用効果が発現したものと考えられる。また、Pessini ら<sup>31)</sup>もベンゼン環上の水酸基には抗菌活性の発現があることを報告<sup>29)</sup>していることから同様な関与により発現したものと考察した。

以上のことから、今回対象とした生薬は汎用性のものであり、単離した化合物の様々な効果、効能について明らかにすることができ、これらの新たな生理活性発現に基づいた様々な分野での用途が考えられる。

## 5. 参考文献

- 林 輝明, 東野正行, リンドウ科植物を基源とする生薬の研究(第3報), 漢薬秦芫の苦味成分とその含有量について, *薬学雑誌*, Vol. **96** (3), pp. 362-365 (1976).
- 田中耕一郎, 奈良和彦, 千葉浩輝, 生薬と漢方薬の辞典, 日本文芸社出版(2020年4月).
- 幸井俊高 著, 漢方のエッセンス, 日経ドラッグインフォメーション編集(2020年7月).
- 中西 勤, 植物界(生薬及び植物)から薬用成分の検索と構造研究, *YAKUGAKUZASSHI*, **127**(12), pp. 1975-1996(2007).
- 高木健三, フラボノイドによる抗アレルギー活性の新規作用機序の検討, 科学研究費補助金研究成果報告書 様式 C-19 (平成 21 年).
- 三橋 博, “生薬学”, (株)南江堂, (1983), pp. 100-101, 186-190.
- 原島広至, “生薬単”, (株)エヌ・ティー・エス, (2012), pp. 134-135.
- 原島広至, “生薬単”, (株)エヌ・ティー・エス, (2012), pp. 266-267.
- 原島広至, “生薬単”, (株)エヌ・ティー・エス, (2012), pp. 166-167.
- 赤坂和昭, 森宗孝介, 大類 洋, 目黒 熙, 太田 実, 高速液体クロマトグラフィーポストカラム法による血しょう及び血清中のホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの定量, *分析化学*, **49** 巻 1 号, pp. 27-31(1993).
- 吉岡千尋, 鈴木裕志, 石川昌子, 横倉武文, 白崎俊浩, 高速液体クロマトグラフィー/ポストカラム誘導化法を用いる河川水及び水道水中のグリホサートとその主要代謝物アミノメチルリン酸の定量, *BUNSEKI KAGAKU*, Vol. **55**, No. 3, pp. 177-184(2006).
- 船山智代, 科学的思考力の育成を目指した学生主体の化学実験プログラムの作成 —ラジカル消去率の測定による物質の抗酸化能の評価—, *文教大学教育学部「教育学部紀要」*, 第 **49** 集, p. 231-240(2015).
- 菌田邦博, 玉田葉月, 浅野(白崎)友美, 橋本沙幸, リンゴ果汁の褐変および DPPH ラジカル消去活性に対する柑橘系果実果汁添加の影響, *金城学院大学論文, 自然科学編*, 第 **12** 巻 第 2 号, pp. 29-36 (2016).
- 受田浩之, 酸素スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の活性測定法, *Dojin News*, No. **96**, pp. 1-9 (2000).
- Inoue T, Sugimoto Y, Masuda H, Kamei C, anti-allergenic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biologi. & Pharma. Bulletin*, Vol. **25** (2), pp. 256-259 (2002).
- 永井千春, ヒト癌由来細胞株を用いた Dipeptidase の局在, 機能解析, *福島医学雑誌*, **67**(3), pp. 139-148 (2017).
- 袴田淑篤, 佐藤 弘, 工藤 孝, 鈴木義規, 齊木 博, 下村美文, ハロー法によるヒノキチオールの抗菌性試験, 第 **24** 回廃棄物資源循環学会研究発表会講演論文, pp. 357-358 (2013).
- Yan Zhou, Ying-Tong Di, Suolang Gesang, Shu-Lin Peng, Li-Sheng Ding, Secoiridoid Glycosides from *Swertia mileensis*, *Helv. Chim. Acta*, Vol. **89** (1), pp. 94-102 (2006).

- 19) Alicia M, Wright and Gregory W. O'Neil, Total Synthesis of Honokiol by Selective Samarium-Mediated Allylic Benzoate Reduction, *Tetrahedron Letters*, Vol. **57**(31), pp.3441-3443 (2016).
- 20) 松下雪郎, 食品における脂質酸化の問題点, *日本油化学会誌*, **36**(1), pp. 3-9 (1987).
- 21) 藤本健四郎, 油脂および油脂食品の酸化的劣化とその評価法に関する研究, *日本油化学会誌*, **46**(3), pp. 249-259 (1997).
- 22) 吉川敏一(編著), 抗酸化物質のすべて, 先端医学社 (1998).
- 23) 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃 真, “抗酸化物質 フリーラジカルと生体防御”, (株)学会出版センター, (1994), pp. 108-109.
- 24) 寺尾純二, 油脂の酸化とその制御 -最近の話題-, *日本食品科学工業会誌*, **43**(7), pp. 775-779 (1996).
- 25) 寺尾純二, 酸化ストレスを制御する食品機能成分の活性発現機構に関する統合研究, *日本栄養・食科学会誌*, 第**68**巻 第1号, pp. 3-11 (2015).
- 26) 田中敏郎, 平野 亨, 比嘉慎二, 有光潤介, 河合麻里, アレルギーとフラボノイド, *日本補完代替医療学会誌*, 第**3**巻 第1号, pp. 1-8 (2006).
- 27) 寺尾純二, ケルセチン配糖体の吸収代謝と活性発現機構, *ビタミン*, **79**巻 1号, pp. 3-11 (2005).
- 28) 町田浩一, リグナン配糖体およびネオリグナン配糖体の構造解析学的研究, *東北薬科大学研究誌*, **58**, pp. 1-12 (2011).
- 29) 奥山 徹, “エッセンシャル 天然薬物化学”, (株)医歯薬出版, (2007), p109.
- 30) 吉川雅之, “生薬学・天然物化学”, (株)化学同人, (2008), pp. 132-134.
- 31) G. L. Pessini, B. P. D. Filho, C. V. Nakamura, D. A. G. Cortez, Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C.DC.) Yunck, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol.**98** (8), pp.1115-1120 (2003).
- 32) 平井裕子, 高瀬英樹, 古林浩子, 山本道子, 藤岡尚美, 神田博史, 山崎和男, 安原 義, 中嶋暉躬, 肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用を指標とした抗炎症生薬のスクリーニング, *生薬学雑誌*, **37**(4), pp. 374-380 (1983).
- 33) 青山千宏, 山本浩代, 大橋憲太郎, 奥山治美, シソ種子抽出物のヒスタミン遊離抑制作用, 第**46**回日本食品科学工業会講演集, p. 118 (1999).
- 34) 谷内一彦, 櫻井英子, 岡村信行, 倉増敦朗, 「他領域からのトピックス」抗ヒスタミン薬の薬理学, *日耳鼻*, **112**, pp. 99-103 (2009).