

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780168

研究課題名（和文） 樹木タンニン類の酸化が関与する反応特性の解明

研究課題名（英文） Characteristics of oxidative reactions of condensed tannins and related polyphenols.

研究代表者

橋田 光 (HASHIDA KOU)

独立行政法人森林総合研究所・バイオマス化学研究領域・主任研究員

研究者番号：40353809

研究成果の概要（和文）：樹木タンニン類の酸化が関与する反応特性の解明を目的とし、タンニンとアミン類との反応挙動の解明を行った。芳香核モデル化合物、タンニン単量体・二量体及び樹木から抽出したタンニン類を用いて *n*-プロピルアミンとの反応を検討した結果、酸素存在下でピロガロール核のアミノ化が起きること、カテコール核ではアミノ化は顕著でないことを明らかにした。以上から、ピロガロール核を有する樹木タンニン類は、酸化的条件下で一級アミン類とアミノ化反応を起こす特性を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To clarify the characteristics of oxidative reactions of condensed tannins, reaction behaviors of condensed tannins and related polyphenols with *n*-propylamine were studied. By the investigations using polyphenolic model compounds, monomeric and dimeric flavanols and natural condensed tannins, it was revealed that the pyrogallol nucleus reacts with *n*-propylamine in the presence of molecular oxygen to form aminated products. In contrast, the catechol nucleus did not cause a clear amination with *n*-propylamine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：抽出成分・微量成分

1. 研究開始当初の背景

樹木タンニン（縮合型タンニン）類は多くの高等植物に広く分布する高分子ポリフェノール化合物であり、抗酸化活性や種々の生物活性を有する植物の防御物質である。抗酸化活性や関連する生物活性を理解する上で、活性物質の酸化反応挙動や反応特性を知る

ことは非常に重要であるが、樹木タンニン類の酸化反応挙動などに関する知見はほとんど得られていない。

我々は、樹木タンニン類の有用機能及び化学反応特性に関する研究を行っており、これまでに、樹木タンニン類は酸素存在下でアンモニアと容易に反応し、アミノ化反応を起こ

すことを見いだした。このことからタンニンは酸素酸化により反応性が高まり、アミン類など様々な物質と反応することが示唆され、本特性が樹木タンニン類の様々な特性や機能、さらには樹木においてタンニンが担う役割に深く関わっていることが予想された。

2. 研究の目的

樹木タンニン類の特性や機能に関わると考えられる、タンニンの酸化が関与する反応特性を明らかにすることを目的とした。具体的には、樹木タンニン類の酸素酸化による変性挙動と、それに引き続いて起こるアミン類などの求核試薬との反応特性の解明を目的とした。

3. 研究の方法

樹木タンニン類との反応が予想される一級アミンである *n*-プロピルアミン (PrAm) を用い、樹木タンニン類との反応挙動の解明を行った。樹木タンニン類は複雑な高分子であり、分析が困難なことが予想されることから、より単純な構造の (1) 芳香核モデル化合物及び (2) タンニン単量体・二量体を用いることから反応特性の解明に着手し、その結果を踏まえて (3) 樹木タンニン類の反応特性の解明を行った。

(1) 芳香核モデル化合物の反応

空気雰囲気下での反応：芳香核モデル化合物を反応容器内に入れて密栓し、脱イオン水及び PrAm を加えて反応を開始させた。室温で所定時間攪拌後、反応液を酢酸水溶液に加えて反応を停止させ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で反応生成物を分析した。

アルゴン雰囲気下での反応：空気雰囲気下と同様に芳香核モデル化合物を反応容器に入れ、減圧脱気、アルゴン注入を繰り返すことでアルゴン置換した。脱イオン水および PrAm を加えて反応を行い、酢酸水溶液で反応停止後 HPLC 分析を行った。

反応生成物の単離同定：分取 HPLC を用いて反応生成物を単離し、核磁気共鳴 (NMR) 分析、質量分析 (MS) 分析により単離化合物の構造解析を行った。

(2) タンニン単量体・二量体の反応

タンニン単量体の反応：タンニン単量体としてエピガロカテキン (EGC) 及びエピカテキン (EC) を用いて PrAm との反応を検討した。芳香核モデル化合物と同様に、空気雰囲気下及びアルゴン雰囲気下で、室温での反応を行い、HPLC で反応生成物を分析した。また、反応生成物の単離同定も同様に行い、円二色性 (CD) 分析により生成物の絶対構造の解析を行った。

タンニン二量体の反応：EGC 及び EC を用い、

Alharthy らの方法 (Tetrahedron Lett., 51:1193-1195, 2010) に基づいて二量体の合成を行い、B 環がピロガロール型のプロデルフィニジン B2 (PDB2) 及びカテコール型のプロシアニジン B2 (PCB2) を調製した。これら二量体と PrAm との反応を空気雰囲気下、アルゴン雰囲気下で行い、HPLC で反応生成物を分析した。

(3) 樹木タンニン類の反応

樹木タンニン類として、モリシマアカシア (*Acacia mearnsii*) 樹皮及び市販のケブラコ (*Schinopsis balansae*) 材抽出物 (ATO, Unitán) から抽出・精製したタンニンを用いた。NMR 分析により、アカシアタンニンはピロガロール核を有するプロロピネチニジン、ケブラコタンニンはカテコール核を有するプロフィセチニジンが主骨格であることを確認した。これらタンニンと PrAm との反応を室温で、空気雰囲気下及びアルゴン雰囲気下で行い、酢酸を加えて反応を停止させた。反応液に脱イオン水を加え、遠心分離で不溶部を洗浄した。可溶部及び洗浄液は Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを用い、脱イオン水で溶出させて酸・塩を除去し、50% アセトン水溶液で溶出させてタンニン成分の回収を行った。不溶部及び可溶部を混合して反応生成物とした。NMR、赤外分光 (IR) 分析により反応生成物の化学構造変化を分析し、反応生成物をアセチル化した後にゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 分析を行うことで、平均分子量の変化を分析した。

4. 研究成果

(1) 芳香核モデル化合物の反応

タンニンの B 環を構成するピロガロール核及びカテコール核を有するモデル化合物について PrAm との反応挙動を検討した。ピロガロール核を有するピロガロール及びガリク酸では、空気雰囲気下、1h の反応により出発物質が大きく減少し、反応生成物が確認された。本反応はアルゴン雰囲気下ではほとんど進行しなかったことから、反応へ酸素の関与が確認された。空気雰囲気下での反応生成物を検討した結果、ピロガロールから 2 位プロピルアミノ化物、3 位プロピルアミノ化物を、ガリク酸から 3 位プロピルアミノ化物、4 位プロピルアミノ化物をそれぞれ単離同定した。一方、カテコール核を有するカテコール及びプロトカテキン酸では、空気雰囲気下、1h の PrAm との反応により、出発物質が僅かに減少したが、反応物の生成は明確ではなかった。

タンニンの A 環要素のモデルであるレゾルシノール及びフロログルシノールを用いて PrAm との反応を検討した結果、レゾルシノールは PrAm とほとんど反応しないことを明ら

かにした。一方、フロログシノールは空気及びアルゴン雰囲気下の何れの条件でも PrAm との反応による生成物が確認された。フロログシノールの反応生成物を検討した結果、5 位プロピルアミノ化物を単離同定した。

以上の結果から、ピロガロール核有する化合物は、PrAm と酸素酸化を経由したアミノ化反応を起こすことが示された。また、フロログシノールは酸素酸化とは無関係にアミノ化反応を起こすことが示された。

(2) タンニン単量体・二量体の反応

① タンニン単量体の反応

タンニンを構成する単量体として B 環がピロガロール核の EGC 及びカテコール核の EC を用いて PrAm との反応を検討した。ピロガロール核を有する EGC と PrAm との反応では、空気雰囲気下、1h で出発物質がほとんど無くなり、いくつかの反応生成物が確認された。PrAm 水溶液はアルカリ性であることから、pH 12 の緩衝液中における EGC の挙動についても検討した結果、空気雰囲気下、1h で EGC は大きく減少したが、生成物は PrAm による反応と異なることを確認した。EGC の空気雰囲気下での反応生成物を検討した結果、EGC の 3' 位プロピルアミノ化物及び 4' 位プロピルアミノ化物、エントガロカテキン (*ent*-GC) の 3' 位プロピルアミノ化物を単離同定した (図 1)。反応への酸素の影響を明らかにするため、アルゴン雰囲気下での反応を検討した結果、1h 後も EGC は 7 割程度残存し、アミノ化合物の生成が抑制されたことから、アミノ化反応への酸素の関与が示された。また、アルゴン雰囲気下の PrAm 反応では、空気雰囲気下とは異なる化合物の生成が確認された。アルゴン雰囲気下での生成物の単離同定を行った結果、EGC の 2 位の異性化物である *ent*-GC

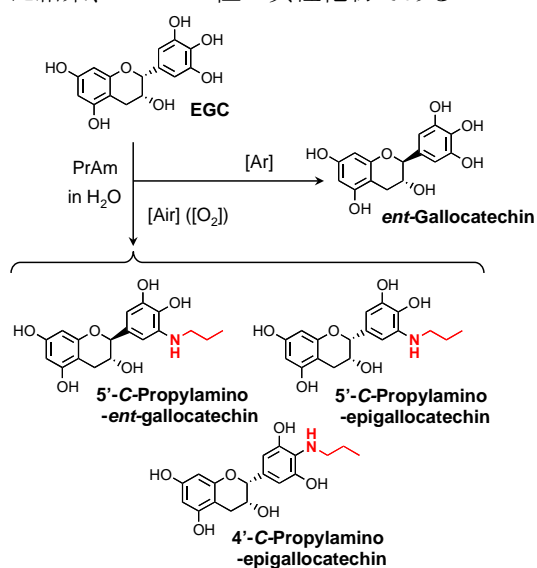


図 1 EGC と PrAm との反応

であることを明らかにした。本化合物はアルゴン雰囲気下、pH 12 での反応においても生成が確認されたことから、アルカリ反応により EGC の 2 位の異性化が起こることが示された。

B 環にカテコール核を有する EC の PrAm との反応では、空気雰囲気下、1h の反応で出発物質が半分程度まで減少したが、主生成物は pH 12 のアルカリ反応による生成物と一致した。本化合物の単離同定を行った結果、EC の 2 位の異性化物であるエントカテキン (*ent*-C) であることを明らかにした。

以上の結果から、B 環にピロガロール核を有する EGC では PrAm との反応により酸素酸化を経由したアミノ化反応を起こすことを明らかにした。一方、B 環がカテコール核の EC では、本実験条件下においてアミノ化反応は顕著でなく、アルカリ反応による 2 位の異性化が主反応として起こることを明らかにした。

② タンニン二量体の反応

タンニン二量体として B 環がピロガロール核の PDB2 とカテコール核の PCB2 を合成し、これらと二量体と PrAm との反応を検討した。ピロガロール核を有する PDB2 の反応では、空気雰囲気下、1h で出発物質がほとんど無くなり、いくつかの反応生成物が確認された。これら生成物から、HPLC の保持時間が EGC の 3' 位プロピルアミノ化物及び 4' 位プロピルアミノ化物、*ent*-GC の 3' 位プロピルアミノ化物と一致するピークが確認され、PDB2 と PrAm との反応による単量体のアミノ化合物の生成が示唆された。また、PDB2 のアルゴン雰囲気下の反応では、プロピルアミノ化合物の生成が抑制されたことから、反応への酸素の関与が示唆された。

B 環にカテコール核を有する PCB2 と PrAm との反応では、空気雰囲気下、アルゴン雰囲気下共に出発物質は減少し、何れの条件も類似の主生成物を生じることが示された。これら生成物から、HPLC の保持時間が EC 及び EC の 2 位異性化物である *ent*-C と一致するピークが確認されたことから、PCB2 のアルカリ反応による単量体の生成が示唆された。

以上の結果から、B 環にピロガロール核を有する PDB2 は PrAm との反応により酸素酸化を経由したピロガロール核のアミノ化反応を起こすことが示唆された。また、PDB2、PCB2 の何れにおいても単量体の生成が示唆されたことから、A 環フロログシノール型のタンニン二量体は、アルカリ反応により構成単位間結合が開裂することが示唆された。本研究において合成できたタンニン二量体は少量であったため、PrAm との反応による生成物の詳細な分析ができなかった。二量体の反応挙動を明確にするため、反応生成物の単離同

定など、より詳細な検討が必要と考えられる。

(3) 樹木タンニン類の反応

樹木由来の縮合型タンニンとして、ピロガロール核を多く有するモリシマアカシア樹皮タンニン、カテコール核を多く有するケブラコタンニンを、PrAm との反応を検討した。タンニンと PrAm との反応生成物を ^{13}C -NMR で分析した。アカシアタンニンの空気雰囲気下での反応生成物は、プロロビネチニン骨格のピロガロール核の炭素 2', 6' 位に帰属される 108 ppm、4' 位に帰属される 133 ppm、3', 5' 位に帰属される 146 ppm 付近のピークが減少し、プロピルアミノ基の炭素 3 位に帰属される 12 ppm、2 位に帰属される 23 ppm、1 位に帰属される 46 及び 51 ppm 付近のピークが確認されたことから、タンニン分子中のピロガロール核へのプロピルアミノ化反応が示された (図 2)。また、アルゴン雰囲気下での PrAm との反応生成物では、プロロビネチニン骨格炭素由来のピークはほとんど変化がなく、プロピルアミノ基炭素由来のピークの上昇が抑制されたことから、アミノ化反応の抑制が示され、反応への酸素の関与が示された。一方、カテコール核を多く有するケブラコタンニンと PrAm との反応では、空気雰囲気下での生成物においてもプロフィセチニン骨格由来のピークにほとんど変化がないが、僅かにプロピルアミノ基炭素由来のピークが確認された。また、タンニンと PrAm との反応生成物を IR で分析した結果、アカシアタンニンの反応生成物で、2,800~3,000 cm^{-1} 付近の C-H 伸縮振動吸収が反応時間と共に増加することが明らかとなり、反応によるプロピルアミノ基の導入が示された。ケブラコタンニンの反応生成物においても、アカシアタンニンほど顕著ではないが、同様の傾向にあることを確認した。タンニンと PrAm との反応による平均分子量変化を検討した結果、アカシアタンニンでは反応により重量平均分子量が大きく増加すること、ケ

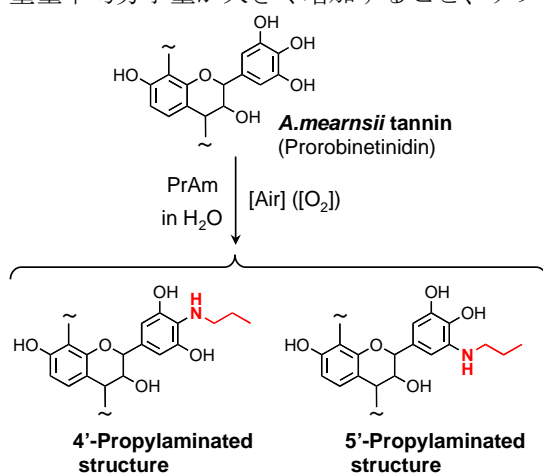


図 2 アカシアタンニンと PrAm との反応

ラコタンニンでは反応後も平均分子量にほとんど変化がないことを明らかにした。

以上の結果から、ピロガロール核を多く有するモリシマアカシア樹皮タンニンは PrAm との反応により酸素酸化を経由したピロガロール核のアミノ化反応を起こすこと、反応により平均分子量が増加することを明らかにした。一方、カテコール核を多く有するケブラコタンニンでは、PrAm によるアミノ化反応は顕著ではないが、僅かにプロピルアミノ基の導入反応が起こることが示唆された。

本研究のまとめとして、樹木タンニン類及び関連化合物において、特にピロガロール核構造を有する物質は、「酸化的条件下で一級アミン類とアミノ化反応を起こす」という反応特性を有するという結論に至った。本特性は、例えばアミンオキシダーゼ様活性 (Akagawa ら, Euro. J. Biochem., 1953-1963, 2001) など、ポリフェノール類の酸化的条件下での生物活性と深く関係すると予想されることから、本特性をより詳細に研究することで、樹木タンニン類の特性・機能に関わる知見に繋がると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ①橋田光、久保智史、牧野礼、大原誠資、フラバノール類と *n*-プロピルアミンとの反応挙動 II -エピガロカテキンのアミノ化反応挙動-、日本木材学会、2012 年 3 月 17 日、北海道大学農学部 (札幌)
- ②橋田光、久保智史、牧野礼、大原誠資、縮合型タンニンと *n*-プロピルアミンとの反応挙動、日本木材学会、2012 年 3 月 15 日、北海道大学農学部 (札幌)
- ③橋田光、牧野礼、大原誠資、フラバノール類と *n*-プロピルアミンとの反応挙動、日本木材学会、2011 年 3 月 18 日、京都大学農学部 (京都)
- ④橋田光、牧野礼、大原誠資、多価フェノール核と *n*-プロピルアミンとの反応挙動、日本木材学会、2010 年 3 月 17 日、宮崎市民プラザ (宮崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋田 光 (HASHIDA KOU)
独立行政法人森林総合研究所・バイオマス
化学研究領域・主任研究員
研究者番号：40353809