

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18727

研究課題名(和文) 汚染空気の酸化作用に対する樹皮タンニンの低減効果の解明

研究課題名(英文) Antioxidative activity in vapor phase against nitrogen dioxide of condensed tannin from bark

研究代表者

牧野 礼 (Makino, Rei)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員等

研究者番号：50353850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：液相で高い抗酸化能を持つ縮合型タンニンの気相抗酸化能を検討した。タンニンは、気相において代表的な大気汚染物質である二酸化窒素の酸化作用を抑制する効果があり、単量体のカテキンよりも重合体であるタンニンにおいて高いことが明らかになった。また、タンニンは二酸化窒素除去能があること、A環の水酸基は除去能に影響せずB環の水酸基が重要であること、pyrogallol型のB環構造がcatechol型よりも高い除去能であることが分かった。さらに、電子供与性の置換基により除去能が増加することが明らかになり、B環の電子密度を高める化学変換により、タンニンの二酸化窒素除去能の向上が期待できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Condensed tannin is a polymeric polyphenol abundantly contained in many barks and has high antioxidant activity in liquid phase. Antioxidative activity in vapor phase of tannin was examined with nitrogen dioxide which is a representative air pollutant. Tannin decreased oxidation of linolic acid by nitrogen dioxide, while catechin, a polyphenol monomer, had little antioxidative activity. Additionally, tannin had NO<sub>2</sub> removal activity, B-ring structure contributed NO<sub>2</sub> removal activity and electron-donating substituent on B-ring enhanced NO<sub>2</sub> removal activity.

研究分野：樹木化学

キーワード：タンニン 樹皮 抗酸化能 二酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

縮合型タンニンとは、樹皮に豊富に含まれる高分子ポリフェノール成分であり、フラバノール構成単位が重合した化合物である(図1)。樹皮は、木質系残廃材の中でも未利用率が高く、かつ発生量が多いため、利用促進が望まれている。樹皮抽出物中の縮合型タンニン含有量は、国産樹木ではヤナギ、カラマツで約15-30%、外国産樹木ではアカシアで50%に達する樹種もあり、有用なバイオマス成分として付加価値の高い用途開発の期待が大きい。

縮合型タンニンは、赤ワインの有効成分と同じポリフェノール成分であり、抗酸化能、蛋白質吸着能、ホルムアルデヒド吸着能、重金属吸着能などの多くの有用機能を示す。タンニンが持つ有用機能の中で抗酸化能は関心が高く、カテキン(タンニンの代表的な構成単位の一つ)等の低分子量化合物やフランス海岸松樹皮タンニンは、人の体内での活性酸素やフリーラジカル除去に高い活性があることから、健康補助食品に利用されている。しかし、これらは液相での抗酸化能であり、気相での効果は明らかにされていない。

気相における抗酸化能は、ローズマリー抽出物<sup>1)</sup>やトドマツ葉油等の揮発性成分<sup>2)</sup>で、二酸化窒素を酸化促進剤として用いて報告されており、トドマツ葉油ではテルペン類が主要な抗酸化成分と明らかになっている。しかし、二酸化窒素との反応物と推定されるニトロ化物等は検出されず、化学的吸着とは異なるメカニズムが報告されている。

タンニンの気相に対する活性は、ホルムアルデヒド吸着能や悪臭吸着能等が報告されているが、気相に対する抗酸化能についてはほとんど研究されていない。二酸化窒素との反応については、カテキンとその誘導体で二酸化窒素ラジカルの消去能が報告されている<sup>3)</sup>。また、カテキンと二酸化窒素は、ニトロ化物を生成する化学的吸着をすることが報告されている<sup>4)</sup>が、いずれも液相で行われている。

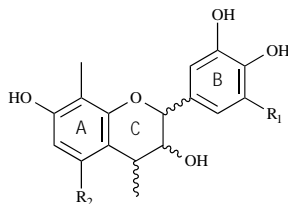


図1 タンニンの化学構造

2. 研究の目的

本研究は、酸化促進剤である二酸化窒素を用いてタンニンの気相抗酸化能を解明することにより、気相に対するタンニンの新たな有用機能を明らかにすることを目的とする。

本研究では、樹皮からタンニンポリマーを抽出・精製し、フラバノール構成単位、構成芳香核、分子量等の化学的性状を明らかにし、これら化学的性状が明確なタンニンを用い

て、気相抗酸化能を明らかにする。また、タンニンの構成単位のモデル化合物を用いて構造活性相関を明らかにする。

3. 研究の方法

国産樹木及び外国産樹木の樹皮 70%アセトン水抽出物からタンニンを常法により精製し(図2)、化学的性状(フラバノール構成単位、構成芳香核、分子量)を明らかにした。

気相抗酸化試験は、精油の気相抗酸化試験法<sup>1)</sup>に準じて行った。タンニン含浸試料用紙とリノール酸及び二酸化窒素ガスを混合し、酸化リノール酸の吸光度の測定により、気相抗酸化能を評価した。また、タンニンを 100 ppm の二酸化窒素に暴露し、化学的性状の変化について各種分析を行った。樹皮タンニンの二酸化窒素除去試験は以下で行った。所定量のタンニンをガラス管内のウエスに保持させ、その後、10 ppm の二酸化窒素を通過し、通過後の二酸化窒素濃度を検知管(ガステック、No.9L)により測定し、二酸化窒素除去能を算出した。また、低分子量フラバノール化合物等を用いて構造活性相関を明らかにした。

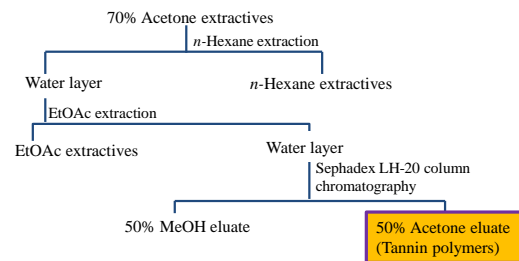


図2 タンニンの精製

4. 研究成果

国産樹木及び外国産樹木の樹皮 70%アセトン水抽出量は、21.8-41.3%であった(表1)。最も抽出量が多かったのはアカシアで、最も少なかったのは、カラマツであった。タンニンポリマーの収量(抽出物に対する重量%)は、13.8-52.0%で、最も高かったのはヤナギで、最も低かったのはスギであった。タンニンオリゴマーの収量は、2.7-16.0%であり、ポリマーよりも少ない収量であった。最も多かったのはアカシアで、最も少なかったのはトドマツであった。

表1 樹皮70%アセトン抽出物及びタンニンの収量

	70%アセトン抽出物	タンニンオリゴマー	タンニンポリマー
	% <sup>1)</sup>	% <sup>2)</sup>	
アカシアマンギウム	41.3	16.0	25.0
ワットル	-	-	18.3
エゾノキヌヤナギ	28.3	2.8	52.0
トドマツ	26.5 <sup>3)</sup>	2.7	38.3
カラマツ	21.8	6.7	45.3
スギ	36.1	8.6	13.8
ケブラコ	-	-	17.2

1) 絶乾樹皮に対する重量% 2) 抽出物に対する重量% 3) 絶乾脱脂樹皮に対する重量%

各種機器分析より、各タンニンの主な構成単位は、アカシア及びワットルは prorobinetinidin、ケブラコは profisetinidin、カラマツ及びスギは

procyanidin、ヤナギ及びトドマツはprocyanidinとprodelphinidinであった。タンニンのB環芳香核の水酸基は、液相での抗酸化能に影響することが分かっている。アカシア、ワットルは、pyrogallol型のB環構造であり、ケブラコ、カラマツ、スギは、catechol型であった。ヤナギとトドマツは両方の構造を持っていた。各タンニンの平均分子量は、オリゴマーが3-5量体、ポリマーが4-8量体であった。

リノール酸を用いてタンニンの気相抗酸化能を評価した結果、アカシアタンニン、スギタンニン共に二酸化窒素によるリノール酸の酸化を抑制する効果が認められた(図3)。アカシアタンニンは、pyrogallol型のB環構造であり、スギタンニンはcatechol型であることから、両方のB環構造で気相での酸化抑制効果を持つことが分かった。一方、単量体のカテキンでは酸化抑制効果は認められなかった。

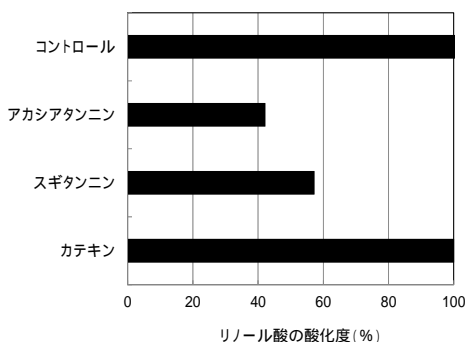


図3 タンニンの酸化抑制効果

タンニンと二酸化窒素の反応物を分析した結果、熱分解GC/MSの結果から、pyrogallol核の減少が認められた。分子量は、一部の樹種で減少したが、ほとんどの樹種では変化は認められなかった。元素分析の結果、窒素の導入が認められたが、樹種により差があった。

酸化作用の低減メカニズムを明らかにするため、タンニンの二酸化窒素除去能を測定した結果、タンニンは二酸化窒素を除去する機能があり、かつ単量体よりも重合体であるタンニンが高いことが分かった(図4)。タンニンの重合度と二酸化窒素除去能との関係をオリゴマーとポリマーを用いて検討した結果、オリゴマーよりポリマーで除去能が高い傾向があったが、樹種によりその傾向に差があった。

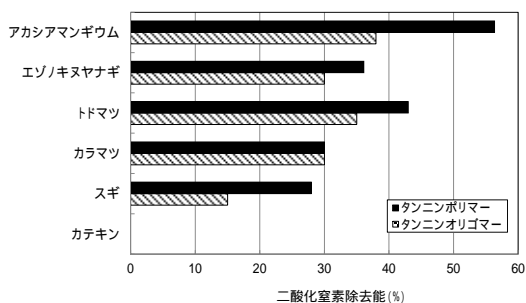


図4 タンニンの二酸化窒素除去能

タンニンの二酸化窒素除去機構について検討するため、水酸基をアセチル化したタンニンを調製し、二酸化窒素除去能を測定した(図5)。その結果、アセチル化タンニンでは除去能が大きく減少した。このことから、二酸化窒素除去能には水酸基が関わっていることが分かった。

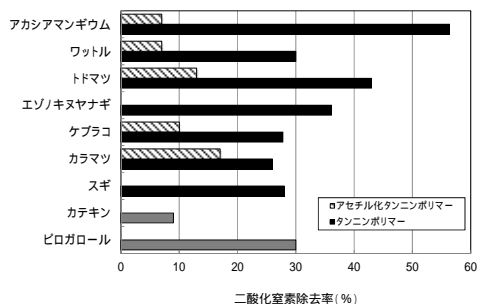


図5 アセチル化タンニンの二酸化窒素除去能

タンニンの構成芳香核のモデル化合物を用いて除去能を比較したところ、B環構成芳香核であるcatechol、pyrogallolは除去能があったが、A環構成芳香核であるresorcinol、phloroglucinolは除去能がなかった。このことからA環構造の水酸基は除去能に影響せず、B環構造の水酸基が重要であることが分かった。また、B環構成芳香核では、pyrogallol型がcatechol型よりも高い除去能であることが分かった。

二酸化窒素除去能と置換基の関係を検討するため、B環構成芳香核の誘導体を比較した結果、4-methylcatechol及び5-methylpyrogallolでは、catechol及びpyrogallolより二酸化窒素除去能は高かった(図6)。一方、3,4-dihydroxybenzoic acid、

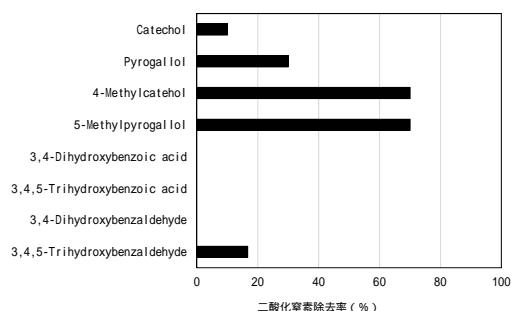


図6 B環構成芳香核モデル化合物の二酸化窒素除去能

3,4,5-trihydroxybenzoic acid、3,4-dihydroxybenzaldehyde及び3,4,5-trihydroxybenzaldehydeでは、除去能はほとんど認められなかった。このことから、電子供与性の置換基を持つ構造では除去能が増加し、電子求引性の置換基を持つ構造は減少すると考えられ、B環芳香核の電子密度が除去能に大きく影響することが明らかになった。したがって、タンニンの気相に対する酸化抑制効果は、B環構成芳香核の電子密度を高める化学変換により向上できる可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Saito et al., Effects of a Novel Gaseous Antioxidative System Containing a Rosemary Extract on the Oxidation Induced by Nitrogen Dioxide and Ultraviolet Radiation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(4), 781-786, 2004
- 2) 大平他, 樹木精油による環境汚染物質の除去, *AROMA RESEARCH*, 13(4), 308-312, 2012
- 3) Miao et al., The scavenging reactions of nitrogen dioxide radical and carbonate radical by tea polyphenol derivatives: a pulse radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry*, 60(3), 163-168, 2001
- 4) Yan et al., Nitrogen Dioxide Absorbance Capacity of Flavonols Quantified by a NO<sub>2</sub>-Selective Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(23), 5253-5258, 2014

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Rei Makino and Koh Hashida, Chemical characterization and efficient extraction of condensed tannin from the bark of juvenile *Salix* species, *Bulletin of FFPRI*, 17(1), 35-42, 2018, 査読有

〔学会発表〕(計3件)

牧野礼、橋田光、松井直之、大平辰朗. 樹皮タンニンの二酸化窒素除去機構の解明(2). 第68回日本木材学会大会、2018年

牧野礼、橋田光、松井直之、大平辰朗. 樹皮タンニンの二酸化窒素除去能の解明. 第67回日本木材学会大会、2017年

牧野礼、橋田光、松井直之、大平辰朗. 二酸化窒素の酸化作用に対する樹皮タンニンの低減効果の解明. 第66回日本木材学会大会、2016年

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

牧野 礼 (MAKINO, Rei)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員等

研究者番号：50353850