

ナツメグ (*Myristica fragrans* Houttuyn) 種子中の化学成分とその生理活性について前田阿紀,<sup>a</sup> 谷本真一,<sup>a</sup> 阿部 智,<sup>a</sup> 風間舜介,<sup>b</sup> 谷澤久之,<sup>c</sup> 野村正人<sup>\*,a</sup>Chemical Constituents of *Myristica fragrans* Houttuyn Seed and Their Physiological ActivitiesAki MAEDA,<sup>a</sup> Shinichi TANIMOTO,<sup>a</sup> Tomo ABE,<sup>a</sup> Shunsuke KAZAMA,<sup>b</sup>  
Hisayuki TANIZAWA,<sup>c</sup> and Masato NOMURA<sup>\*,a</sup><sup>a</sup>Graduate School of System Engineering, Program in Systems Engineering, Kinki University, 1 Umenobe, Takaya, Higashi-Hiroshima City 739-2116, Japan, <sup>b</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan, and <sup>c</sup>Department of Human Life Science, Hiroshima Jogakuin University, 4-13-1 Ushita Higashi, Higashi-ku, Hiroshima 732-0063, Japan

(Received July 11, 2007; Accepted September 18, 2007)

The antioxidative activity of phenylpropanoid compound extracts from nutmeg (*Myristica fragrans* Houttuyn) seed was determined. The antioxidant activity was evaluated using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging method, superoxide dismutase assay, ferric thiocyanate assay, and radical-scavenging effect assay with electron-spin resonance. High antioxidant activity was found in monoterpenoid extracts including terpinene-4-ol (**3**),  $\alpha$ -terpineol (**4**), and 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol (**12**). Compound, **12** expressed particularly high antioxidant activity.

**Key words**—*Myristica fragrans* Houttuyn; antioxidant activity; phenylpropanoid

## 緒 言

人類が最も身近に親しんでいる植物は、生体の維持のために種々の化合物を生合成あるいは代謝を繰り返しながら成長を続けている。ナツメグ (*Myristica fragrans* Houttuyn) は、ニクズク科の常緑高木であり、インドネシア、スリランカ、及び西インド諸島などの熱帯及び亜熱帯地域で栽培され、果実の中の緋紅色の殻種子がメース、殻の中の種子がナツメグと呼ばれている。その主な用途としては、香辛料以外に駆風薬、芳香健胃薬として服用されている。<sup>1-3)</sup> その主成分としては、 $\alpha$ -pinene, *d*-camphene, myristicin (**10**), safrole 及び elemicin (**11**) などが知られている。そのナツメグを大量に服用した場合には、**10** の影響と考えられる精神高揚活性 (幻覚, 非現実感, 陶酔感, 妄想) が認められることが報告されている。<sup>1,4,5)</sup>

一方、最近のナツメグに関する研究によると、Mila らはグリコシド結合を持つ揮発性物質の単離及びナツメグの精油と遊離したアグリコンの抗酸化活性の比較を行い、モノテルペノイドに抗酸化能があるということを報告している。<sup>6)</sup>

そこで今回、筆者らはナツメグ種子から得た油中に存在する化学物質を明らかにすると同時に、新たな生理活性を発現するフェニルプロパノイド系化合物の分離を目的に本研究を行った。構造を確認した化合物の抗酸化能発現の有無を判断する試験方法として、今回、DPPH ラジカル消去効果試験、活性酸素阻害効果試験、脂質酸化抑制効果試験及び ESR を用いたラジカル消去能に対する試験を行った。その結果、著しい効果を発現するフェニルプロパノイド系化合物を見出すことができたので報告する。

## 実 験 方 法

**1. 試料の調製** 試料は、栃本天海堂㈱から入手した市販品ナツメグ種子の粉末を使用した。

**2. 溶媒抽出による分画** ナツメグ種子の粉末

<sup>a</sup>近畿大学大学院システム工学研究科システム工学専攻,  
<sup>b</sup>静岡県立大学薬学部製薬学科, <sup>c</sup>広島女学院大学生生活科学部生活科学科

\*e-mail: nomura@hiro.kindai.ac.jp

500 g を 11 のメタノールに 1 ヶ月間浸漬した後、メタノールを留去し 35 g の油分（黒褐色）を得た。ついで、油分 10 g をヘキサン、ジエチルエーテル及び酢酸エチルを用いて順次抽出した後、溶媒を留去し、ヘキサン抽出部から 4.8 g、ジエチルエーテル抽出部から 2.3 g、酢酸エチル抽出部から 0.2 g 及び水層部から 1.5 g の油分を得た。

**3. 機器分析** 各溶媒抽出による油分に対する抗酸化能の試験結果 (Table 1) から、著しいラジカル消去能が認められた酢酸エチル抽出部について、GC-MS (SHIMADZU GC-2010, SHIMADZU GCMS-QP2010) を測定し成分の確認を行った。分析条件としては、Column は Rtx-5SilMS (0.28 mm × 30 m) を用いて、Column Temp.: 40°C [10 min hold] ~ 330°C [10°C/min], Injection: 300 °C で行った。

#### 4. 生理活性試験

**4-1. DPPH ラジカル消去効果試験** それぞれの化合物の 1 mM エタノール溶液を作成し、既報<sup>7)</sup> に準じて操作し、517 nm に設定した分光光度計で測定した。

**4-2. 活性酸素阻害効果 (SOD) 試験** それぞれの化合物の 3 mM DMSO 溶液を作成し、SOD 活性検出キット (和光純薬社製) を用いて既報<sup>7)</sup> に準じて操作し、560 nm に設定した分光光度計で測定した。

#### 4-3. ESR を用いたラジカル消去能の測定 2

mM の galvinoxyl エタノール溶液 100  $\mu$ l に各化合物の 2 mM エタノール溶液 100  $\mu$ l を加え、混合したのちキャピラリーに採取し測定試料とした。ついで、室温 (20 ± 2°C) で ESR 信号強度の時間変化を測定し、抗酸化物質によるラジカルの消去を 2 次反応と仮定した。

抗酸化物質及び galvinoxyl の初期濃度は等しく、反応速度は  $dx/dt = k(a-x)^2$  になると仮定し、 $a$  は galvinoxyl の初期濃度、 $x$  は時刻  $t$  における反応生成物の濃度、 $a-x$  は時刻  $t$  における galvinoxyl の濃度、 $k$  は速度定数とした。この式を積分すると、 $x/a(a-x) = kt$  となる。すなわち、時間  $t$  に対するラジカル消去反応の速度定数  $k$  を求め抗酸化能を評価した。

**4-4. AAPH 添加ロダン鉄法<sup>8,9)</sup>** 1.3% リノール酸/エタノール溶液 2.5 ml, 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2.5 ml, 蒸留水 1 ml に各化合物のエタノール溶液 (0.2 mM) を 0.5 ml, 46.4 mM AAPH [2,2-azobis- (2-amidinopropane) dihydrochloride] 水溶液 0.25 ml を混合したものを反応液とし、50°C の恒温槽中で遮光保存した。次に、この反応液 0.1 ml に 75% エタノール溶液 4.7 ml, 30% チオシアン酸アンモニウム水溶液 0.1 ml 及び 3.5% 塩酸溶液に 0.02 M の第一塩化鉄を溶解した混合液 0.1 ml を添加し、3 分経過後に 500 nm に設定した分光光度計で測定した。以後、同反応液を用いて、2 時間間隔で 8 時間まで同様の操作を行った。なお、測定は 3 連で行い、数値は平均値で表した。

## 結果及び考察

入手容易なナツメグ種子の粉末をメタノールに浸漬後、溶媒を留去し得られた油分について、極性が異なるそれぞれの溶媒 (ヘキサン、ジエチルエーテル及び酢酸エチル) を順次用いて抽出し、各油分を得た。ついで、Table 1 に示した各油分について、ラジカル捕捉活性を明らかにすることを目的とした DPPH ラジカル消去効果試験と SOD 活性を明らかにすることを目的とした活性酸素阻害効果試験を行った。その結果、DPPH ラジカル消去効果試験においては、ジエチルエーテル抽出部及び酢酸エチル抽出部に、比較物質として用いた  $\alpha$ -tocopherol (94.7%) 及び ascorbic acid (97.5%) の値に近い消去効果 (93.1%, 95.4%) が認められ、高いラジカ

Table 1. DPPH Radical Scavenging Effect Assay and Superoxide Dismutase Assay of Seed of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houttuyn)

| Extract                            | DPPH radical scavenging effect    |                                | Superoxide dismutase activity effect |
|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
|                                    | Scavenging rate (%) <sup>a)</sup> | SC <sub>50</sub> <sup>b)</sup> | Obstruction rate (%) <sup>c)</sup>   |
| Methanol                           | 93.8                              | 26                             | 16.4                                 |
| Hexane                             | 73.1                              | 92                             | 20.3                                 |
| Diethyl ether                      | 93.1                              | 15                             | 39.0                                 |
| Ethyl acetate                      | 95.4                              | 7                              | 46.1                                 |
| Residue                            | 90.3                              | 24                             | 40.0                                 |
| $\alpha$ -Tocopherol <sup>d)</sup> | 94.7                              | 13                             | 7.8                                  |
| Ascorbic acid <sup>d)</sup>        | 97.5                              | 7                              | 18.7                                 |

a) Concentration: 0.2 mg/ml. b) 50% Scavenging concentration:  $\mu$ g/ml. c) Concentration: 1.0 mg/ml. d) Concentration: 1.0 mM.

ル消去能を有していることが分かった。また、活性酸素阻害効果試験においては、比較物質として用いた ascorbic acid よりも、ジエチルエーテル抽出油、酢酸エチル抽出油に高い SOD 活性があることを確認した。

これらの結果に基づき、高い抗酸化能を示した酢酸エチル抽出油について、GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) 分析を行ったところ、Fig. 1 に示した GC-MS チャートを得ることができ、主な出現ピーク (1)–(22) について構造を確認した (Fig. 2)。また、それぞれの化合物の組成割

合を Table 2 に示す。なお、主成分は、terpinene-4-ol (3), methyl eugenol (7), 10, 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol (12), 及び p,p-Di (1-aziridinyl)-N-(4-methylphenyl) phosphinic amide (22) であった。

次に、主成分として得られた 8 種類の化合物 (3, isosafrole (5), eugenol (6), 7, isoeugenol (8), methyl isoeugenol (9), 10, 12) について、DPPH ラジカル消去効果試験及び活性酸素阻害効果試験を行った。その結果を Table 3 に示す。主成分として得られた 10 (17.60%) は、肝臓障害抑制作用があるとの報告<sup>10)</sup>があり、今回、筆者らが行った抗酸化活性につ

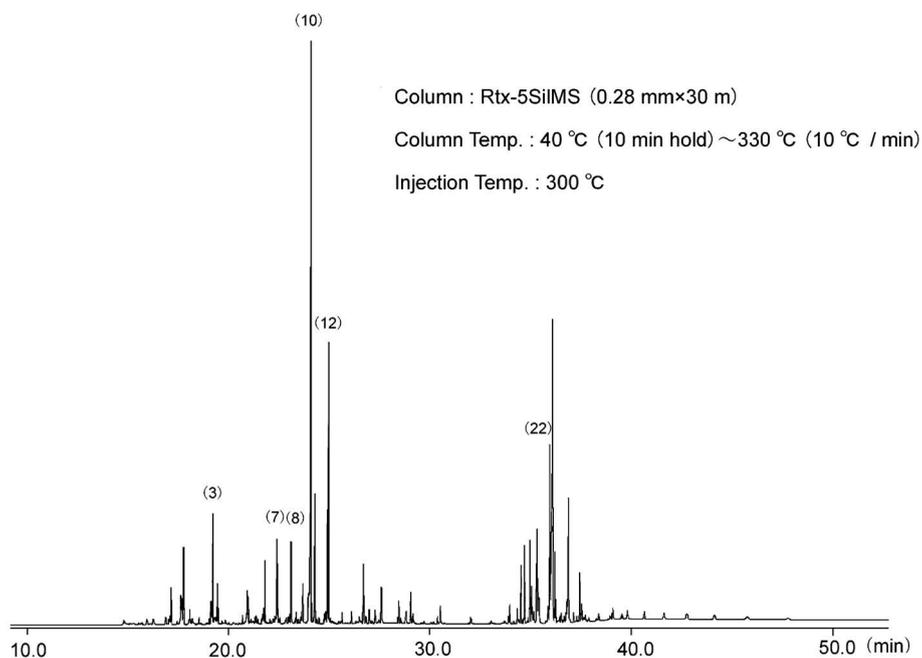


Fig. 1. Gas Chromatogram of Ethyl Acetate Extract

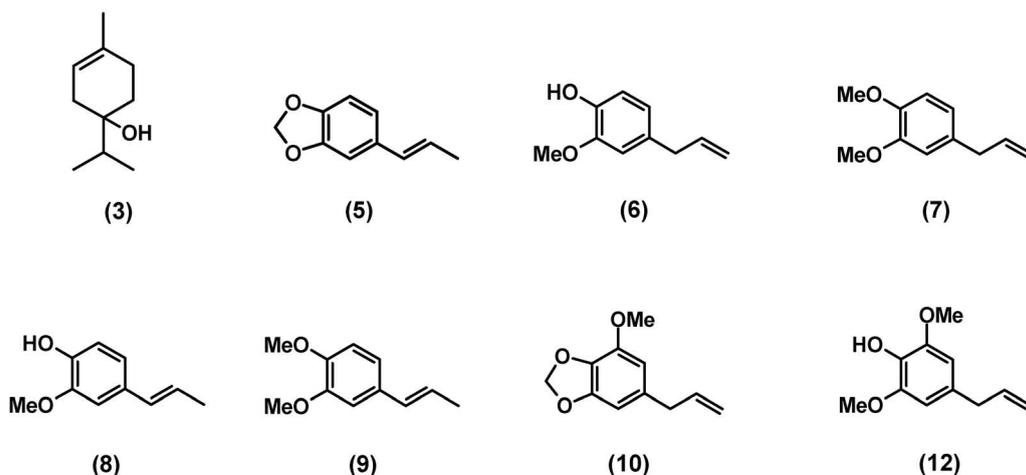


Fig. 2. Chemical Structures of Major Components in Ethyl Acetate Extract

Table 2. Major Components of Ethyl Acetate Extract

| R.T. (min) | Compound                                  | Composition area (%) | R.T. (min) | Compound   | Composition area (%) |
|------------|---|----------------------|------------|--|----------------------|
| 17.69      | Linalool (1)                              | 0.64                 | 26.71      | Tetradecanoic acid (13)  | 1.72                 |
| 18.09      | <i>trans</i> -Carane- <i>cis</i> 4-ol (2) | 0.33                 | 28.84      | Dibutyl phthalate (14)   | 0.34                 |
| 19.20      | Terpinene-4-ol (3)                        | 3.10                 | 29.05      | 3,4,5-Trimethoxy benzeneethanamine (15)  | 0.90                 |
| 19.44      | $\alpha$ -Terpineol (4)                   | 1.15                 | 30.52      | Oleic acid (16)  | 0.48                 |
| 20.93      | Isosafrole (5)                            | 0.79                 | 34.51      | 1-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1-propanone (17)                                       | 1.99                 |
| 21.80      | Eugenol (6)                               | 1.59                 | 35.15      | 9-Octadecenoic acid (18)   | 0.53                 |
| 22.40      | Methyl eugenol (7)                        | 2.27                 | 35.31      | Dehydrodiisoeugenol (19)   | 2.94                 |
| 23.11      | Isoeugenol (8)                            | 2.15                 | 35.42      | 2,4,7-Trimethyl carbazole (20)   | 0.73                 |
| 23.69      | Methyl isoeugenol (9)                     | 1.61                 | 35.87      | Eugenyl acetate (21)   | 0.46                 |
| 24.07      | Myristicin (10)                           | 17.60                | 35.95      | <i>p,p</i> -Di(1-aziridinyl)- <i>N</i> -(4-methylphenyl) phosphinic amide (22) | 5.79                 |
| 24.28      | Elemicin (11)                             | 3.24                 | —          | Others <sup>a)</sup>   | 42.29                |
| 24.93      | 4-Allyl-2,6-dimethoxyphenol (12)          | 7.36                 | —          | Total  | 100.00               |

a) Others consisted of several components.

Table 3. DPPH Radical Scavenging Effect Assay and Superoxide Dismutase Assay of Compounds in Ethyl Acetate Extract

| Compound                           | DPPH radical scavenging effect    |                                | Superoxide dismutase activity effect |
|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
|                                    | Scavenging rate (%) <sup>a)</sup> | SC <sub>50</sub> <sup>b)</sup> | Obstruction rate (%) <sup>c)</sup>   |
| (3)                                | N.D.                              | >400                           | 12.0                                 |
| (5)                                | N.D.                              | >400                           | N.D.                                 |
| (6)                                | 96.3                              | 20                             | 20.9                                 |
| (7)                                | N.D.                              | >400                           | 7.3                                  |
| (8)                                | 94.2                              | 28                             | 25.9                                 |
| (9)                                | N.D.                              | >400                           | 6.5                                  |
| (10)                               | N.D.                              | >400                           | N.D.                                 |
| (12)                               | 93.8                              | 12                             | 43.4                                 |
| $\alpha$ -Tocopherol <sup>d)</sup> | 94.7                              | 13                             | 7.8                                  |
| Ascorbic acid <sup>d)</sup>        | 97.5                              | 7                              | 18.7                                 |

a) Concentration: 0.2 mM. b) 50% Scavenging concentration:  $\mu$ M.

c) Concentration: 3 mM. d) Concentration: 1.0 mM. N.D.: No detected.

いては検討されていないことから本試験を行ったところ、著しい活性発現は認められなかった。一方 **12** は、50% DPPH ラジカル消去濃度 (SC<sub>50</sub>) において、比較物質である  $\alpha$ -tocopherol と同等の数値を示し、高いラジカル消去能を有していることが分かった。その他の化合物 **6** 及び **8** においても良好なラジカル消去効果が発現することを確認することが

Table 4. Radical Scavenging Effect Assay by ESR of Compounds in Ethyl Acetate Extract

| Compound             | K<br>[ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ] |
|----------------------|---|
| (6)                  | 0.17  |
| (8)                  | 0.10  |
| (12)                 | 6.60  |
| $\alpha$ -Tocopherol | 35.00   |

できた。一方、活性酸素阻害効果試験においては、**6**, **8**, 及び **12** に高い SOD 活性数値を示すことが分かった。両試験の結果から、**12** がいずれも高い抗酸化能を発現する化合物であることが分かった。

次に、このような良好なラジカル消去能効果が得られた化合物について、ラジカル消去反応の速度定数からラジカル消去能を明らかにすることを目的に ESR による評価試験を行った。その結果を Table 4 に示す。化合物の  $x/a(a-x)$  を時間に対するプロットで評価した。その結果、それぞれの化合物に対するラジカル消去の速度定数を比較したところ、 $\alpha$ -tocopherol > **12** > **6** > **8** となり、DPPH ラジカル消去効果試験の濃度変化の測定から求めた SC<sub>50</sub> によるラジカル消去能と同様の結果を示し、電子供与の速度が大きいものが高いラジカル消去能を示すことが分かった。

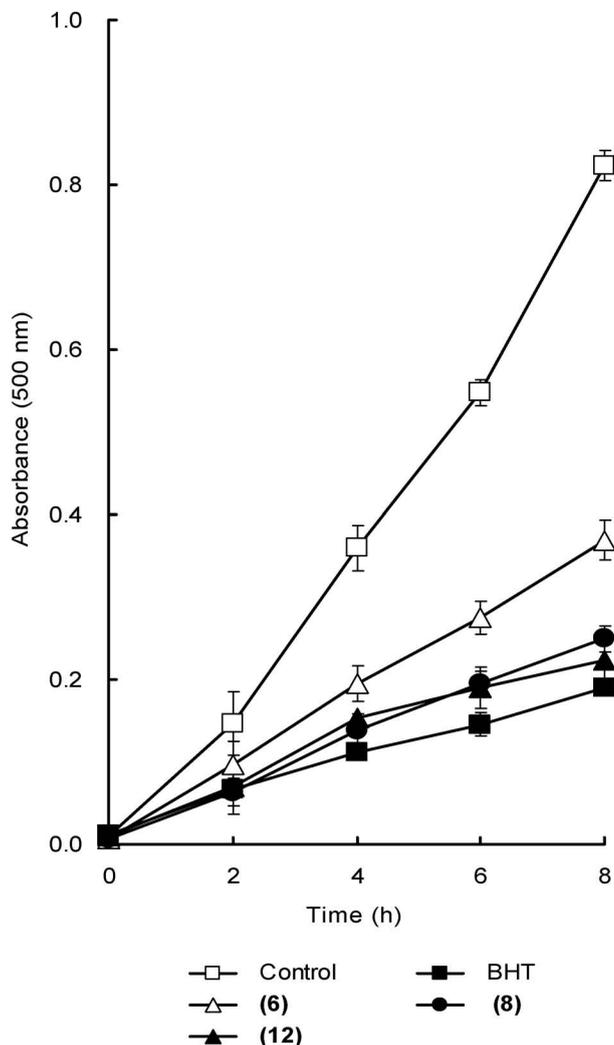


Fig. 3. Ferric Thiocyanate Assay

次に、脂質の過酸化を抑制する効果を明らかにすることを目的にロダン鉄試験を行った。その結果を Fig. 3 に示す。試料無添加のコントロールは、時間とともに吸光度の値が上昇し過酸化脂質の増加が認められたが、既知の抗酸化剤である BHT (butylated hydroxytoluene) では吸光度の上昇が抑えられ、高い脂質酸化抑制効果を示した。脂質過酸化の前段階である活性酸素の阻害効果において良好な結果が認められたナツメグ種子中に含有する **8** 及び **12** は、8 時間後の吸光度において、比較物質として用いた BHT とほぼ同程度の数値が得られ、高い脂質酸化抑制効果があることを明らかにすることができた。

今回、本研究で行った DPPH ラジカル消去効果試験、活性酸素阻害効果試験、ESR を用いたラジカル消去能の評価及びロダン鉄試験に対して、とくに、**12** はいずれの試験においても良好な結果を得ることができた。このことから、高い抗酸化能を発現する化合物は、ベンゼン環にヒドロキシル基が存在し、しかも *p*-位にアリル基が配位することにより、高い抗酸化能が発現することを確認することができた。

また、ナツメグの種子中に存在するフェニルプロパノイド系化合物の中から **12** の含有を明らかにすることができ、同時に、**6** 及び **8** を含む 3 成分 (GLC 含有率, 11.10%) の含有割合が大きい酢酸エチル抽出油に高い抗酸化能が発現した要因の 1 つになっているものと考えられる。

#### REFERENCES

- 1) Tanaka K., *Toyaku Zasshi*, **20**(9), 34-38 (1998).
- 2) Tajuddin., Shamsad A., Abdul L., Iqbal A. Q., *BMC Complement. Altern. Med.*, 3-6 (2003).
- 3) Furuoya F., Horiguchi K., Komatsu H., Nemoto Y., *Food Chem.*, **12**, 63-70 (1994).
- 4) Morarak Z., Zaki N., Bieniek D., El-Darawy Z., *Chemosphere*, **10**, 633-639 (1997).
- 5) Opdyke D. L. J., *Food Cosmet. Toxicol.*, **14**, 631 (1976).
- 6) Mila J., Olivera P., Mladen M., *Croatica Chem. Acta*, **79**(2), 209-214 (2006).
- 7) Abe T., Masato N., *Aroma Res.*, **7**(1), 56-62 (2006).
- 8) Misuteru H., Yasumoto K., Iwami K., *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, **19**(3), 210-214 (1966).
- 9) Nagashima M., Fukuda Y., Ito R., *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*, **46**(6), 382-388 (1999).
- 10) Morita K., Sugiyama K., *Aroma Res.*, **5**(1), 23-27 (2004).