# スギ針葉の テルペノイド 成分の 変動について
## -抽出方法による相違 -

(山形大院農)〇渡部大寛、高橋孝悦、芦谷竜矢

## はじめに

スギは針葉の含有ジテルペン成分の違いによっていくつかのケモタイプに分けられる[1]ことが知られている。また、長濱ら[2]は、含有セスキテルペン成分の違いによって九州地方のスギの分類を試みている。このように、スギは同一種内で針葉成分に大きな違いがみられる樹種であるため、成分利用を考える上でもその変異を知ることは重要である。特にセスキテルペン成分による分類については研究例が少なく、東北の多雪地域に生育するスギについての知見も少ない。上記をふまえ、山形大学農学部附属フィールド科学センター生物多様性保全研究園内に植栽されたスギ針葉成分の分析を現在進めている。前報[3]では、スギ針葉のセスキテルペン、ジテルペンのケモタイプの判別を行った。その結果、既存のセスキテルペンの他にcubebolが指標成分になる可能性が示唆された。また、針葉成分の春から秋にかけての変動について検討し、春と比較して秋に主要成分の含有量が増加する個体が多いことがわかった。しかし、試料の抽出から濃縮の過程でモノテルペンやセスキテルペンなどの消失や変質がみられた。そこで、今回濃縮を行わず抽出液を直接分析した。従来の方法（濃縮して分析）と今回の方法（濃縮しないで分析）のテルペノイド成分の比較、ケモタイプの再分類、季節変動、光学異性体比などを検討した。

## 先行研究

### ジテルペン炭化水素での分類

安江ら[1]は、kaurene、phyllocladene、sclareneにより、全国のスギを7タイプに分類

長濱ら[4]は柳杉、屋久杉について、上記3成分以外のent-rosa-5,15-diene、rimueneから分類

Table 1 ジテルペン炭化水素タイプとその特徴[1] (安江らのK,P,Sによる分類)

| ジテルペン | 特徴 |
|---|---|
| Kタイプ | kaureneだけを含んでおり、単一ピークを示すもの、また、大部分はkaureneであるが、phyllocladene、sclarene、isokaureneなどが少量共存し、その混合比は10:0.5以下であるもの |
| Pタイプ | ほとんどphyllocladeneだけのもの、および、他のジテルペンが含まれていてもその混合比が10:0.5以下であるもの |
| Sタイプ | ほとんどsclareneで、少量のsclarene異性体を含むもの |
| KSタイプ | kaureneが主成分で、少量のsclareneが副成分として存在するもの |
| PKタイプ | phyllocladeneが主成分で、少量のkaureneが共存するもの |
| PSタイプ | phyllocladeneが主成分で、少量のsclareneが共存するもの |
| PKSタイプ | 3者が共存して見られるもの |

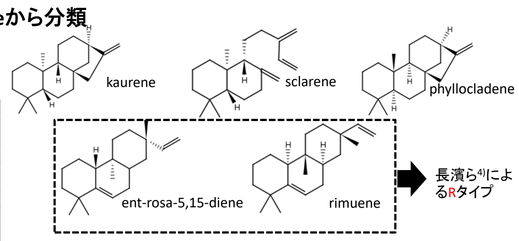



Fig. 1 ジテルペン炭化水素タイプの構造式

### セスキテルペンアルコールでの分類

長濱ら[2]はhedycaryol、4-hydroxygermacrene、thujopsanol、cedrolの4タイプに分類

hedycaryolタイプ: hedycaryolはGC分析の際、熱で容易にCope転移を生じ、elemol、eudesmol類に変化するため、これらをまとめてこのタイプとした。

4-hydroxygermacreneタイプ: 4-hydroxygermacreneは酸の存在下でcadinol類に異性化するためそれらもまとめてこのタイプとした。

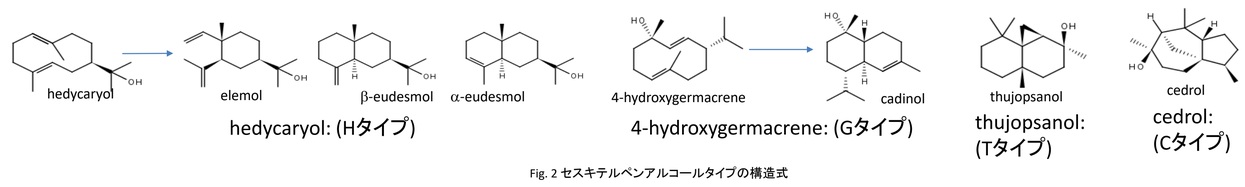



Fig. 2 セスキテルペンアルコールタイプの構造式

### 前報[3]まで

1. 安江らと長濱らのジテルペンによる分類に基づき、78個体をK (50)、P (1)、S (18)、Kr (2)、Ksr (1)、Ps(2)、Pr (3)、Psr (1)の8タイプに分類
2. 長濱らのセスキテルペンによる分類に基づき、78個体をH (64)、H,G (4)、H,T (2)、H,C (8)の4タイプに分類
3. 新たにcubebolを多量に含むタイプを発見 (Cuタイプ)
4. Cuタイプを加えてセスキテルペン・ジテルペンから78個体をK-H (36),K-HG (2),K-HT (2),K-HC (8),K-HCu (1),K-HGCu (1),S-H (17),S-HCu (1),P-H (1),Ps-H (2),Kr-H (2),Pr-H (2),Pr-HG (1),Ksr-H (1),Psr-H (1)の15タイプに分類
5. この15タイプの内秋の分析ではK-H (40), K-HT (2),K-HC (7), S-H (17),S-HCu (1),P-H (2),Ps-H (1),Kr-H (1),Pr-H (4), Ksr-H (1),Ks-H (2)となり11タイプに減少
6. 秋はセスキテルペン・ジテルペン含有量が増加する個体が多い

Fig. 3 cubebolの構造式
(Cuタイプ)

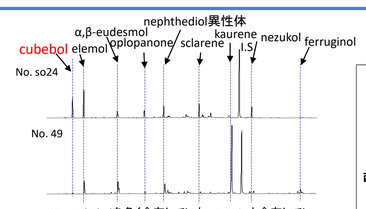



Fig. 4 cubebolを多く含有していたNo. so24と含有していなかったNo. 49のGCMSクロマトグラム

- Cubebolが指標成分として利用できるかどうか
- モノテルペン、セスキテルペン、ジテルペンの質的、量的な変化はなぜ生じるか
  →抽出方法の検討は必要か
  →モノテルペン、セスキテルペンでも分類が可能か
- モノテルペンについては、オオバクロモジでlinaloolの光学異性体比が部位ごとに異なる報告がされている[5]
  →光学異性体比でも分類が可能か

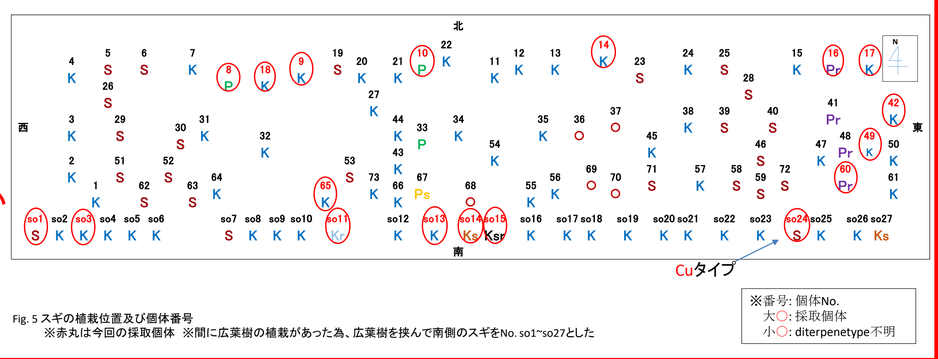



Fig. 5 スギの植栽位置及び個体番号
※赤丸は今回の採取個体 ※間に広葉樹の植栽があった為、広葉樹を挟んで南側のスギをNo. so1~so27とした

## 実験方法

### ・試料

スギ針葉: 18個体 (K type: 9個体, K,s type: 1個体, K,r type: 1個体, K,s,r type: 1個体, P type: 2個体, P,r type: 2個体, S type: 2個体)

採取地: 山形大学農学部附属フィールド科学センター 生物多様性保全研究園 (Fig. 5参照)

採取時期: 2017年4月 - 2018年3月まで毎月

### ・抽出

針葉の1年生を細かく裁断し、抽出率測定用に1 gを三角フラスコに、また、成分分析用に200 mgをミクロ試験管に入れn-ヘキサン、酢酸エチル、メタノールの順に逐次抽出を行った。

### ・濃縮と未濃縮の比較

n-ヘキサン抽出液を濃縮して分析する方法（これまでの方法）と、濃縮を行わず分析する方法を比較したところ、濃縮を行わず分析する方法が、モノテルペン、セスキテルペン、ジテルペンが良好に分析できたため、以降の分析は濃縮をしないで行うこととした。

Fig. 6 スギ針葉の裁断方法

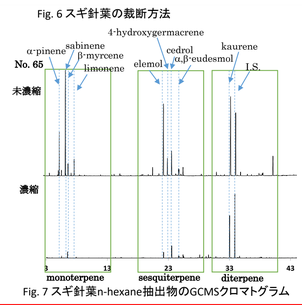



Fig. 7 スギ針葉n-hexane抽出物のGCMSクロマトグラム

### ・定性分析

n-ヘキサン抽出液をそのままGCMSに供した (内部標品にヘネイコサンを使用)
分析機器 : SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra カラム : Rtx-5MS (restek 又は SHIMADZU)
キラル分析カラム : CYCLOSIL-B (Agilent Technologies)
分析条件 : 初期温度50℃ (1分保持) 、最終温度320℃ (5分保持) 、昇温速度5℃/分、気化室温度250℃、インターフェース温度320℃
キラル分析条件 : 初期温度50℃ (1分保持) で150℃まで昇温速度3℃/分、150℃から最終温度320℃ (5分保持) まで昇温速度10℃/分、気化室温度170℃、インターフェース温度240℃

### ・定量分析

n-ヘキサン抽出液をそのままGCFIDに供した (内部標品にヘネイコサンを使用)
分析機器 : SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra カラム : Rtx-5MS (restek 又は SHIMADZU)
キラル分析カラム : CYCLOSIL-B (Agilent Technologies)
分析条件 : 初期温度50℃ (1分保持) 、最終温度320℃ (5分保持) 、昇温速度5℃/分、気化室温度250℃、検出器温度320℃
キラル分析条件 : 初期温度50℃ (1分保持) で150℃まで昇温速度3℃/分、150℃から最終温度320℃ (5分保持) まで昇温速度10℃/分、気化室温度170℃、検出器温度240℃

### ・成分同定

成分の同定はGCMSのシミラリティ検索 (NIST11) 、文献[6]、研究室保有の標品のGCFIDとGCMSのクロマトグラム上のピークの保持時間およびMSスペクトルの比較を行い同定

### ・成分定量

成分の定量は標品から検量線を作成し、含有量を算出

### ・分類

抽出液のまま分析したn-ヘキサン抽出物の結果から18個体をジテルペンタイプ、セスキテルペンタイプで再度タイプ分けした。モノテルペン成分に関しても構成の違う個体がいくつかみられたため、特徴的な構成を分類タイプとしてまとめた。

### ・成分変動

モノテルペン成分、セスキテルペン成分、ジテルペン成分ごとに各タイプの5月から12月の成分の変動をまとめた。

### ・光学異性体比

モノテルペンについては、キラル分析を行い光学異性体の含有があった成分について個体ごとに光学異性体比を算出した。

## 結果・考察

### 1. 再分類 (未濃縮分析)

#### 1-1. スギ針葉n-ヘキサン抽出物のGC,GCMS分析

スギ針葉n-ヘキサン抽出物をGC,GCMS分析すると
モノテルペン (α-pinene, sabinene, β-myrcene, 3-carene, limonene )、セスキテルペン (hedycaryol, elemol, eudesmol, 4-hydroxygermacrene, thujopsanol, cedrol, cubebol )、ジテルペン (rimuene, sclarene, phyllocladene, kaurene, nezukol )が良好に分析できた

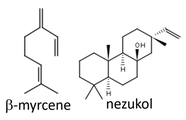



Fig. 8 指標成分以外の主要成分

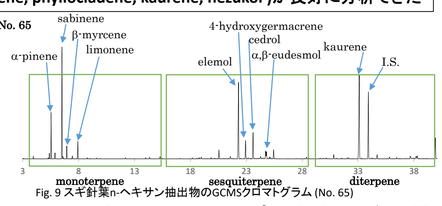



Fig. 9 スギ針葉n-ヘキサン抽出物のGCMSクロマトグラム (No. 65)

#### 1-2. セスキテルペン、ジテルペンのケモタイプによるスギ18個体の分類 (前回 (濃縮分析) と今回 (未濃縮分析) の比較)

Table 2 スギ針葉18個体のケモタイプ (左 : 前報での分類、右 : 今回濃縮せず分析した時の分類)

濃縮分析

| No. | chemotype |
|---|---|
| 8 | P–H |
| 9 | K–H,C |
| 10 | P–H |
| 14 | K–H |
| 16 | P,r–H,G |
| 17 | K–H,G |
| 18 | K–H,T |
| 42 | K–H,G |
| 49 | K–H |
| 60 | P,r–H |
| 65 | K–H,C |
| so1 | S–H |
| so3 | K–H |
| so11 | K,r–H |
| so13 | K–H |
| so14 | K,s–H |
| so15 | K,s,r–H |
| so24 | S–H,Cu |

未濃縮分析では18個体全てで4-hydroxygermacreneが確認された。

未濃縮分析

| No. | chemotype |
|---|---|
| 8 | P–H,G |
| 9 | K–H,G,C |
| 10 | P–H,G |
| 14 | K–H,G |
| 16 | P,r–H,G |
| 17 | K–H,G |
| 18 | K–H,G,T |
| 42 | K–H,G |
| 49 | K–H,G |
| 60 | P,r–H,G |
| 65 | K–H,G,C |
| so1 | S–H,G |
| so3 | K–H,G |
| so11 | K,r–H,G |
| so13 | K–H,G |
| so14 | K,s–H,G |
| so15 | K,s,r–H,G |
| so24 | S–H,G,Cu |

前回の78個体の分析で15タイプが11タイプに変化した原因は濃縮により、4-hydroxygermacreneなどが揮発や変質をしたためと考えられる。

#### 1-3. モノテルペンによるケモタイプの分類

・濃縮を行わず分析したことでモノテルペン成分に関しても構成の違う個体がいくつかみられたため、分類typeとしてまとめた。(5月時点)

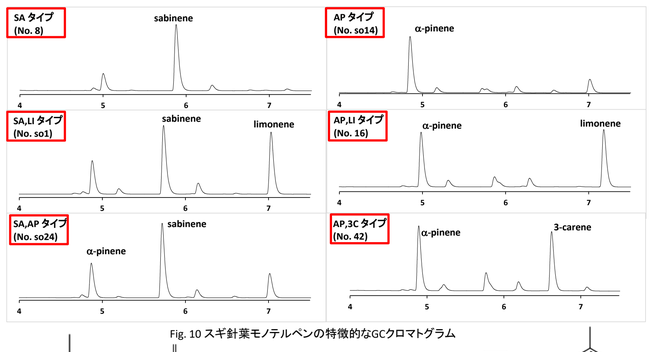



Fig. 10 スギ針葉モノテルペンの特徴的なGCクロマトグラム

6タイプに分類

Table 3 スギ針葉18個体のモノテルペンタイプ

| No. | chemotype |
|---|---|
| 8 | SA |
| 9 | SA |
| 10 | SA |
| 14 | AP |
| 16 | AP,LI |
| 17 | AP,3C |
| 18 | SA,AP |
| 42 | AP,3C |
| 49 | AP,3C |
| 60 | AP,LI |
| 65 | SA |
| so1 | SA,LI |
| so3 | SA |
| so11 | SA |
| so13 | SA |
| so14 | AP |
| so15 | SA,AP |
| so24 | SA,AP |

SA type (sabinene)・・・・・・・・・・・・・・・・7個体
SA,AP type (sabinene,α-pinene)・・・・ 3個体
SA,LI type (sabinene,limonene) ・・・・1個体
AP type (α-pinene) ・・・・・・・・・・・・・・ 2個体
AP,LI type (α-pinene,limonene)・・・・・2個体
AP,3C type (α-pinene,3-carene)・・・・・3個体
に分類できた。

モノテルペンも分類の指標成分に成り得る

### 2. 含水率と抽出率

・含水率は8月まで増加傾向、その後横ばい、ヘキサン抽出率は10月まで増加傾向、その後横ばい

1年生葉にも季節変動がみられた

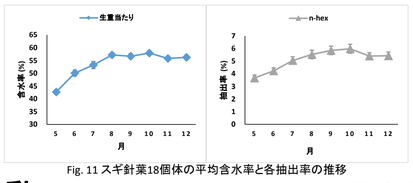



Fig. 11 スギ針葉18個体の平均含水率と各抽出率の推移

### 3. テルペン成分季節変動

#### 3-1. 全体

・モノテルペン含有量は5月から7月にかけて減少し、その後12月まで増加
・セスキテルペン類は6月から8月に増加し、9月、10月に大きく減少、その後11月にまた増加
・ジテルペン類は5月から6月にかけて増加し、その後横ばい

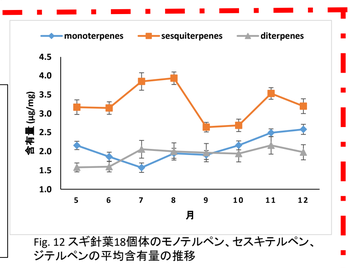
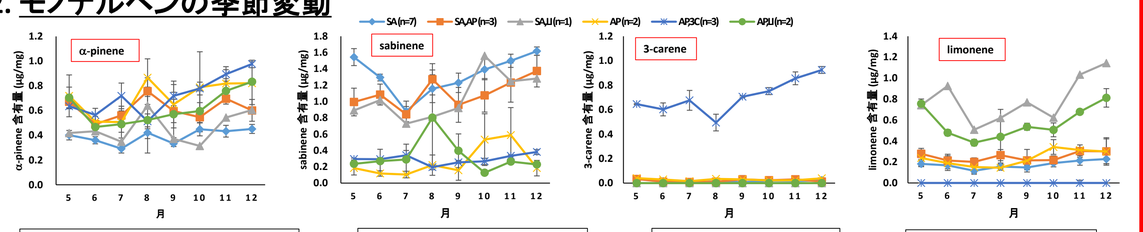



Fig. 12 スギ針葉18個体のモノテルペン、セスキテルペン、ジテルペンの平均含有量の推移

n-ヘキサン抽出率とは異なる変動を示す。

n-ヘキサン抽出物中のGCで直接分析できない成分 (ワックス、酸性部など) の変動を調べる必要がある

#### 3-2. モノテルペンの季節変動




・α-pinene含有量 ⇒ すべての個体に含有されるが、SA type, SA,LI typeでは他のtypeに比べ含有が少ない。
・変動の様子 ⇒ AP,3C typeは7月に増加し、8月に減少して、また増加。その他は8月に急激に増加し、減少してまた増加。

・sabinene含有量 ⇒ すべての個体に含有されるが、SA type, SA,LI type, SA,LI type の含有が多い。
・変動の様子 ⇒ sabineneの含有が多いtypeは、5月から7月まで減少し、また増加。

・3-carene含有量 ⇒ AP,3C type以外は含有されないか、かなり少ない。
・変動の様子 ⇒ 7月まで微増。8月に減少し、また増加。

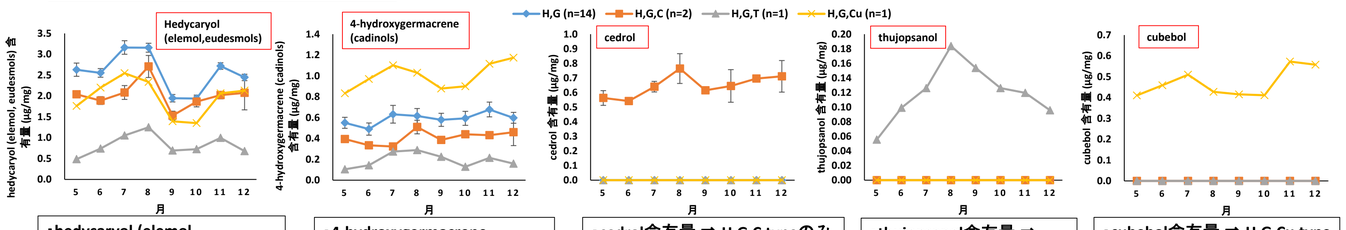
・limonene含有量 ⇒ AP,3C type以外の個体に含有されるが、SA,LI type, SA,AP type の含有が多い。
・変動の様子 ⇒ 7月まで減少し、また増加。

Fig. 13 各モノテルペンタイプごとの主要成分の平均含有量の推移

・モノテルペン類では夏期に含有量が減少する成分が多いが、突発的な増減が多くみられ、不安定であった。
・3-carene,limoneneの含有割合は月によって変わらなかった。

3-carene,limoneneは分類指標として利用可能

#### 3-3.セスキテルペンの季節変動




・hedycaryol (elemol, eudesmols)含有量 ⇒ H,G type, H,G,C type H,G,Cu typeがH,G,T typeよりも含有量が多い。
・変動の様子 ⇒ どのtypeも7月から8月に最大を示し、9月、10月で減少する。その後また増加。

・4-hydroxygermacrene (cadinols)含有量 ⇒ H,G,T type, H,G,C type, H,G type, H,G,Cu typeの順に含有量が多い。
・変動の様子 ⇒ H,G type以外は7月から8月に最大を示す。その後、9月、10月で減少する。その後また増加。

・cedrol含有量 ⇒ H,G,C typeのみに含有する、このtypeは18個体中2個体しかなかった。含有する個体では4-hydroxygermacreneよりも多く含有している。
・変動の様子 ⇒ 8月に最大を示し、9月に減少その後また増加。

・thujopsanol含有量 ⇒ H,G,T typeのみに含有する、このtypeは18個体中1個体しかなかったがそもそものセスキテルペン類の含有量が少ない。
・変動の様子 ⇒ 8月に最大を示し、その後減少。

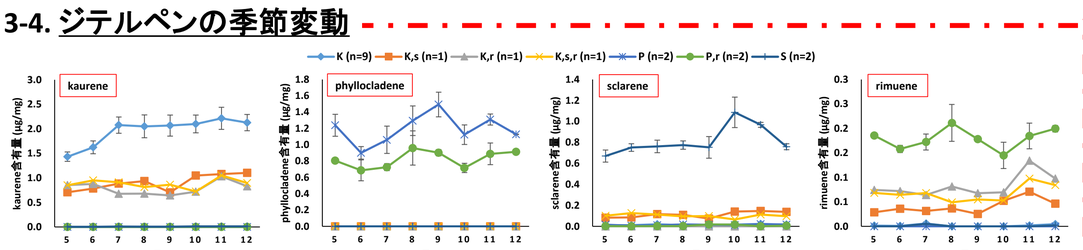
・cubebol含有量 ⇒ H,G,Cu typeのみに含有する、このtypeは苗畑全体でも1個体のみだった。含有する個体では全セスキテルペン中10%以上の割合で含有する。なお、どの月でも10%以上の含有があった。
・変動の様子 ⇒ 7月まで増加し、その後やや減少。また増加し11月に最大を示す。

Fig. 14 各セスキテルペンタイプごとの主要成分の平均含有量の推移

・ hedycaryol (elemol, eudesmols), 4-hydroxygermacrene (cadinols) は18個体すべてで確認されたが、含有量の変動が大きかった。
・cedrol,thujopsanol, は、それぞれ2個体、1個体でのみ確認され、年間を通じて安定して生産されていた。
・cubebol は1個体でのみ確認され、年間を通じて安定して生産されていた。そのため、分類の指標成分として利用可能。
・同一タイプのセスキテルペン成分の構成割合は年間を通じて大きな変化はなかった。

長濱らの示したH,G,T,Cの4タイプ + Cuタイプの組み合わせから分類が可能

#### 3-4. ジテルペンの季節変動




・kaurene含有量 ⇒ K type, Kの混合 type 以外は含有しない、またはかなり少ない。K typeの含有がかなり多く、混合typeはK typeの1/2ほど。
・変動の様子 ⇒ K type は5月から増加し、7月で最大を示す。その後やや減少で推移し、11月にまた最大を示す。K の混合type も11月に最大を示す。

・phyllocladene含有量 ⇒ P type, P,r type 以外に含有がなく、P,r type よりP 単独のtypeの方が含有量が多い。
・変動の様子 ⇒ どちらの type も5月から6月に減少し、その後増加。P typeは9月で最大を示す。P,r typeは8月で最大を示す。

・sclarene含有量 ⇒ S type が他のtypeよりも含有量が多く、K type, P type, K,r type は含有しない、またはかなり少ない。
・変動の様子 ⇒ S type は9月までほぼ横ばいで推移し、10月に増加し、その後減少。K,s type は11月に最大を示す。K,s,r type は6月に最大を示す。

・rimuene含有量 ⇒ P,r type が他のtypeよりも含有量が多く、K、P、S 単独のtypeは含有しない、またはかなり少ない。
・変動の様子 ⇒ Kの混合type で似ている。11月に最大を示す。P,r type は8月に最大を示し、その後減少しまた10月から増加。

Fig. 15 各ジテルペンタイプごとの主要成分の平均含有量の推移

・同一タイプのジテルペン成分の構成割合は年間を通じて大きな変化はなかった。

安江ら、長濱らの示したK,P,S,Rの4タイプの組み合わせから分類可能

### 4. モノテルペンの光学異性体比

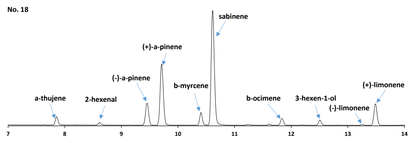



Fig. 16 キラルカラムを用いたモノテルペンのGCMSクロマトグラム (No. 18)

・キラル分析の結果、スギ針葉にはモノテルペンのα-pinene, limoneneの+体、–体の両光学異性体が含有されていることが分かった。

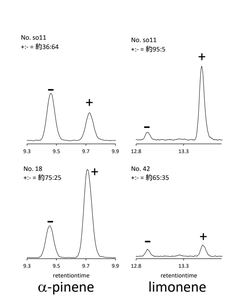



Fig. 17 キラルカラムを用いたモノテルペンのGCMSクロマトグラムの拡大図 (左: α-pinene, 右: limonene)

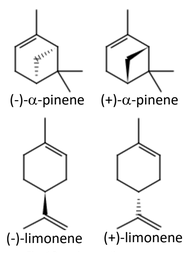



Fig. 18 α-pinene, limoneneの光学異性体の構造

・α-pineneは約95:5~56:45の割合で –体の割合が多い個体が17個体、約25:75の割合で+体の割合が多い個体が1個体存在
・limoneneは約5:95~9:91の割合で+体の割合が多い個体が15個体、それらに比べ、–体の割合が多くなる個体が3個体存在
・これらの異性体比の月ごとの変動は少なかった。

光学異性体比の違いも分類の指標に成り得る

## まとめ

1. 未濃縮で分析すると、モノテルペン、セスキテルペン、ジテルペンが良好に分析でき、4-hydroxygermacreneのように濃縮すると揮発・変質する成分も確認できた。
2. モノテルペンが分析できたことから、モノテルペンにも個体変異があることが判明し、6タイプに分類できた。
3. n-ヘキサン抽出率の季節変動と全テルペン量の季節変動が異なることから、揮発性テルペン以外にも、ワックスや酸性部成分などの影響を受けることが考えられた。
4. モノテルペンの季節変動においてα-pinene,sabineneは含有量も含有割合も変動が大きかったが、3-carene,limoneneの含有割合は各月で変わらなかったことから、指標成分として利用できると考えられた。
5. セスキテルペンの季節変動において、長濱らが示したH,G,T,Cの4タイプの組み合わせから分類が可能であることを確認し、cubebolも年間を通じて生産されていたことから指標成分として利用できると考えられた。
6. ジテルペンの含有量の季節変動はあるものの、成分の構成割合には大きな変化はなく、安江ら長濱らの示したK,P,S,Rの4タイプの組み合わせから分類が可能であることを確認した。
7. モノテルペンについてスギ針葉中にα-pinene,limoneneの光学異性体の存在を確認し、それぞれ異性体比が逆転している個体を確認した。これらの異性体比は各月で変化がなかったため、光学異性体比の違いも分類の指標となり得る。

・未濃縮分析でモノテルペンも含めて良好に分析可能であった。
・モノテルペンのキラル分析を行うと、α-pineneとlimoneneで光学異性体比が異なることが判明した。
・セスキテルペンでは新たにCuタイプ (高cubebol含有) が確認できた。
・ジテルペンでは既存のK,P,S,Rタイプによる分類が有効であった。

### ー今後の課題ー

◎ モノテルペン6タイプや、光学異性体比を用いたモノテルペンでの分類の可能性を確認する。

◎ セスキテルペンではCuタイプ (高cubebol含有) の個体の存在割合 (地理的変異など) を確認する。

◎ n-ヘキサン抽出物中のワックスや酸性部成分の分析による、新たな指標成分を確認する。

◎ 各成分を用いた多変量解析などの統計処理を行う。

参考文献; 1) 安江保民ら, 日本林學會誌, Vol.58(8), pp. 285–290 (1967) 2) 長濱静男, 木科学情報, Vol.9, No.1, p6–9 (2002) 3)渡部大寛ら、日本木材学会大会研究発表要旨集, Vol.67, p240 (2017) 4) Nagahama et al, Phytochemistry, Vol.36, No.1, p77–78 (1994) 5) Inoue et al, Journal of Wood Science, online first (2018) 6) P. Adams, Identification of Essential Oil Component by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed (2012)