

樹木成分の分離方法について ～シラカンバ外樹皮からの抽出成分ベツリンの単離精製の実際～

利用部 バイオマスグループ 関 一人

■はじめに

シラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) (図1左) は、寒冷地においても比較的成長が早いことから、冷温帯に属する北海道では従来より有用な広葉樹資源として認識されています。



図1 シラカンバ林 (左), 同外樹皮 (右)

左: 北海道大学 雨龍演習林, 右: 同農学部 苗畑, 写真提供: 渋井宏美氏

シラカンバの外樹皮 (図1 右) は、コルク組織が多層なため、平滑で薄く剥がれやすくなっています。外樹皮が白いのは、炭素数30・5員環性のトリテルペンであるベツリン (図2 左) が、外樹皮の絶乾重量に対して30%程度と特異的に多く含有するためであるといわれています^{2,3)}。一方、ベツリンやベツリンの一部をカルボキシル基に変換したベツリン酸 (図2 右) は、2010年ころから、多数の薬理学的研究により、正常細胞を除くある種のがん細胞のみを細胞死促進することが明らかになっています^{4,6)}。したがって、ベツリンやその誘導体は潜在的に新たなタイプの抗がん剤としての応用が期待されています。

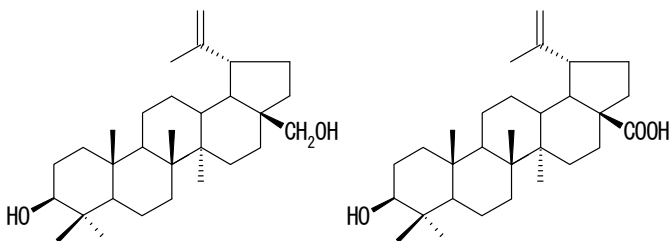


図2 ベツリン (左), ベツリン酸 (右) の化学構造式

化学式: 図 (左) $C_{30}H_{50}O_2$, 図 (右) $C_{30}H_{48}O_3$

これまでに林産試験場では北海道産樹木の材・樹皮・葉における化学成分を精査するとともに、その利用に関して取り組んできました。ここでは、それ

らのうち、シラカンバ外樹皮に含有するベツリンの実験室的な単離精製の実際について紹介します。

■樹皮粉碎物の有機溶媒による抽出

胸高直径20cm程度のシラカンバを伐採し、その丸太から外樹皮を剥皮し、1ヶ月程度、自然乾燥させました。その後、外樹皮を電動式粉碎機を用いて5mm以下の粉碎物を得ました (図3)。



図3 シラカンバ外樹皮の粉碎物

ベツリンは親水性では無く親油性なため、抽出溶媒として、親油性化合物を溶解する性質があり、揮発性を有する有機溶媒であるジクロロメタン (二塩化炭素, CH_2Cl_2) を用いました。300g程度 (絶乾重量, 約2L程度) の粉碎物を5Lビーカーに入れて、ジクロロメタンを5L目盛りまで入れ、電動かく拌機で24時間かく拌しながら抽出しました (図4 左)。得られた抽出液は、ブフナーロート・ろ紙を用いて吸引ろ過し、樹皮粉碎物と分別します。粉碎物中の抽出物を十分に得るために、この操作を3回繰り返しました。ここでの留意点は、有機溶媒を用いる場合は労働安全衛生のために実験用ドラフト (局所排気装置) 内において作業を行うことです。

得られた抽出液をナス形フラスコに入れ、ロータ

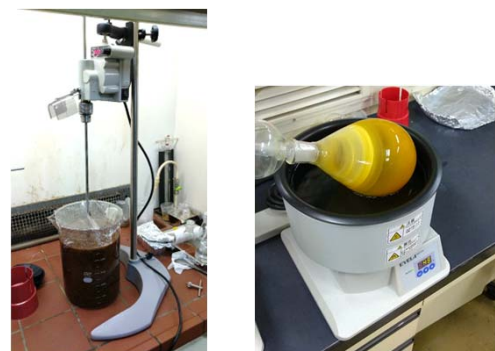


図4 有機溶媒抽出 (左), 減圧濃縮 (右) のようす

リー・エバポレーターを用いて加熱・減圧濃縮し（図4 右），ジクロロメタンを除去しました。これを何回か繰り返して，黄褐色のシロップ状の粗抽出物（固形分140g）を得ました。

■シリカゲルクロマトグラフィーによる粗抽出物の分離

粗抽出物に含有するベツリンとその他の化合物との分離可能性について，シリカゲル薄層クロマトグラフィー（TLC）と特定の有機溶媒を用いて簡易な検討を行いました（図5）。TLCはガラスやアルミの薄い板の上に多孔質のシリカゲル（粒径10 μ m）が塗られています。TLC上に点着させた化合物は有機溶媒を介して吸脱着の相互作用があり，化合物によって移動速度が異なります。この原理は，ペーパークロマトグラフィーでインクの色素を水で分離するのと同じです。ここでは分離の促進を図るために，極性の異なる2種の有機溶媒を混合し，*n*-ヘキサン（C₆H₁₄）：アセトン（C₃H₆O）の混合溶媒（体積比2:1）を用いました。

ベツリン標準物質と粗抽出物のTLC溶媒展開の結果，粗抽出物はベツリンのほかに多数の化合物を含有しているが，分離の可能性はあるということが推定されました（図5 右）。

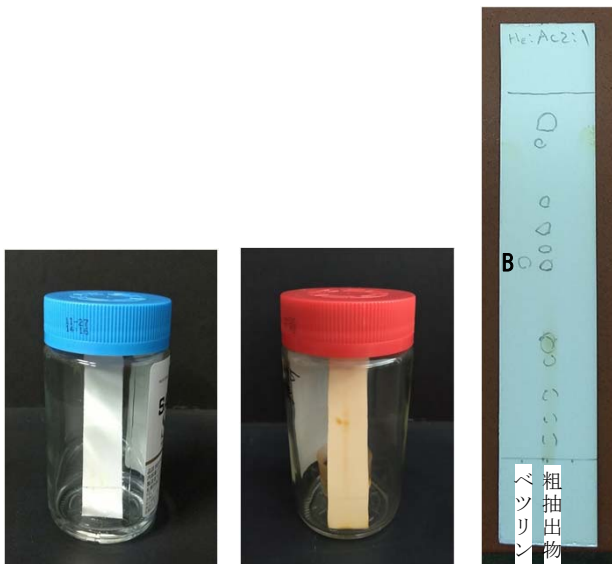


図5 TLCの溶媒展開（左），ヨウ素蒸気雰囲気下での発色（中），同結果（右）のようす

TLCサイズ：1.5×15 cm，図（左）において容器の底から5mm程度まで溶媒を入れる，図（右）における下部線の指定場所に試料点着し上方に溶媒展開させる。B: ベツリン標準物質（市販試薬），図（右）において粗抽出物の列にはいくつもの点があり多数の化合物が混在していることが分かる

TLCの結果を受けて，規模を拡張してベツリンを

分離するために，ガラスカラム（図6 左，内径5×高さ30cm）に500mlのシリカゲル（粒径10 μ m）をTLCと同じ展開溶媒（ヘキサン：アセトン 2:1）とともに詰めて，上部に粗抽出物（固形分5g程度）を展着させ，下部に向けて溶出し（流速10ml/分），100mlづつ三角フラスコで分取しました（図6）。各分取物をさらにTLCで検索したところ，ベツリンが分離されていることが分かり（図7），カラムクロマトグラフィーの操作を繰り返して，ベツリン画分を収集しました。なお，多くの化合物は純度が高まると結晶化する性質がありますが，ベツリンが高濃度に溶出したフラスコでは，溶出液中に結晶が析出すること



図6 シリカゲルカラムクロマトグラフィーの溶媒溶出（左），溶出液の分取と結晶の析出（右）

図（左）において試料はカラム上部に展着し溶媒で下方に溶出させて分取する，図（右）においてフラスコ下部でベツリンの結晶化物が見られる

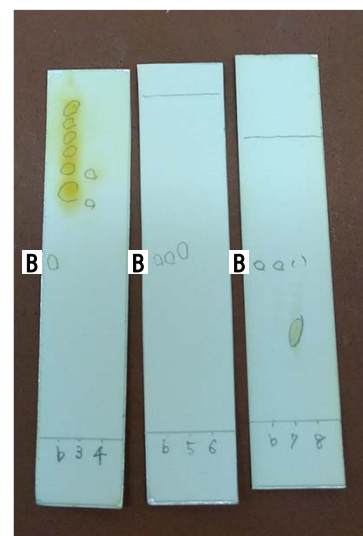


図7 カラムクロマトグラフィー分取物のTLCによる検索のようす

図においてB: ベツリン標準物質（各TLCの左部），TLCの下部番号：分取したフラスコ番号（b: ベツリン標準物質）

もありました (図6 右)。

■再結晶法による粗ベツリンの精製

カラムクロマトグラフィーにより、粗ベツリンが得られました (図8 左)。これには不純物が混在しているため、さらに純度を増加させるために、精製操作のひとつである再結晶法を試みました。具体的には、粗ベツリンの一部を溶解しにくい溶媒 (貧溶媒) に加えて、湯浴中で強制的に溶解させます (図8 中)。今回は、貧溶媒としてエタノールを選択し、溶解後に室温で放冷すると、より純度の高いベツリンの針状結晶が得られました (図8 右)。



図8 粗ベツリン (左), 湯浴中でのエタノールへの溶解 (中), 再結晶化 (右) のようす

ベツリンの結晶を桐山ロート・ろ紙でろ別し、さらにエタノールでろ紙上に残ったベツリンを洗浄します (図9 左)。ろ紙上で洗浄したのち風乾した結晶は、さらにこのような再結晶の操作を何度も繰り返すことにより、より純度の高い精製ベツリンが得られます (図9 右)。

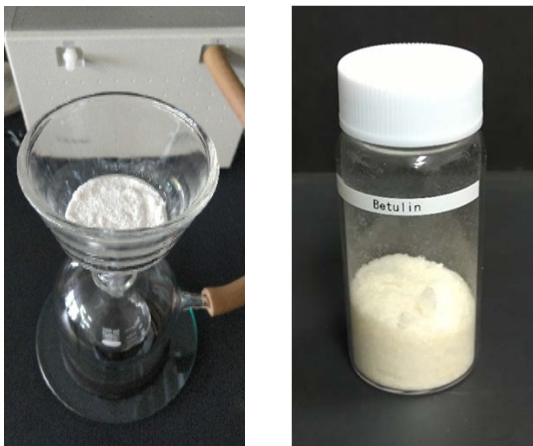


図9 ベツリン再結晶化物の貧溶媒による洗浄とろ別 (左), 精製ベツリン (右)

■おわりに

これまで述べてきたシラカンバ外樹皮からのベツリンの単離精製に関する情報については、今後、北海道産の木質バイオマスによる生理活性物質分野への応用が期待されます。また、シラカンバ以外の北海道産樹木に含有する有効成分の探索と精製方法の開発も、将来的に新たな事業創出の上からも重要であると考えています。

■引用文献

- 1) 大崎久司ほか：木材学会誌 65, 189–194 (2019) .
- 2) 渋井宏美ほか：日本木材学会 北海道支部講演集 第46号, 1–4 (2014) .
- 3) Ohara *et al.* : Mokuzaigakkaishi, 32, 266–273 (1986) .
- 4) Mullauer FB *et al.* : PLOS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005361>. (2009) .
- 5) Dehelean CA *et al.* : Natural Product Communications. 7, 981–985 (2012) .
- 6) Jiang W *et al.* : Biomedicine and Pharmacotherapy, 142, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111990>, (2021) .