

【原 著】

液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC-MS) を用いた ハトムギ全粒熱水抽出エキス (CRD) 中のフェノール化合物分析 Analysis of Phenolic Compounds in Coix-seed Reactive Derivatives(CRD) by Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry(LC-MS)

鈴木信孝^{1,*}, 滝埜昌彦², 大桑(林)浩孝³
Nobutaka SUZUKI^{1,*}, Masahiko TAKINO², Hirotaka OKUWA-HAYASHI³

¹ 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 臨床研究開発補完代替医療学講座

² アジレント・テクノロジー株式会社

³ くらしき作陽大学 食文化学部栄養学科

【要 旨】

ハトムギの外殻・薄皮・渋皮を含む全粒熱水抽出エキス末 (Coix-seed Reactive Derivatives:CRD) 中のフェノール化合物 13 種類とアルカロイド化合物であるコイキソール (coixol) の分析を液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC-MS) を用いて行った。また、対照として市販のハトムギ子実熱水抽出エキス末、ハトムギ全粒粉、ハトムギ子実粉の分析も行った。結果は、CRD 中の各種フェノール化合物は対照群より多く検出され、それぞれ含有量の多い順に *p*-クマール酸 (*p*-Coumaric acid) 275.0(μ g/g), *p*-ヒドロキシベンズアルデヒド (*p*-Hydroxybenzaldehyde) 50.2(μ g/g), カフェイン酸 (Caffeic acid) 36.9(μ g/g), プロトカテク酸 (Protocatechuic acid) 31.9(μ g/g), フェルラ酸 (Ferulic acid) 27.1(μ g/g), ケルセチン (Quercetin) 16.2(μ g/g), シリングアルデヒド (Syringaldehyde) 12.1(μ g/g), クロロゲン酸 (Chlorogenic acid) 11.3(μ g/g), ナリンゲニン (Naringenin) 11.1(μ g/g), バニリン (Vanillin) 9.2(μ g/g), *trans*-コニフェリルアルデヒド (*trans*-Coniferylaldehyde)

9.1(μ g/g), トリシン (Tricin) 0.7(μ g/g), ルテオリン (Luteolin) 0.5(μ g/g) であり、コイキソール (Coixol: 6-Methoxy-2-benzoxazolinone) は 5.5 (μ g/g) であった。以上の結果より、CRD の様々な作用には、これら天然のフェノール化合物の生物作用が深く関与していると考えた。

【キーワード】

ハトムギ, Coix-seed Reactive Derivatives, CRD, 液体クロマトグラフィー / 質量分析法, LC-MS, フェノール化合物, ポリフェノール, コイキソール

はじめに

我々は、ハトムギの外殻・薄皮・渋皮の食効に着目し、酵素処理を組み合わせたハトムギ全粒熱水抽出物 (CRD:Coix-seed Reactive Derivatives) を研究開発した (日本国特許第 3590042 号)。CRD は、従来の子実のみを熱水抽出した漢方薬とは異なり、外殻・薄皮・渋皮のみならず、子実最外層の糠 (bran) の成分も効率よく抽出されているので、従来にない臨床効果を有していることが次第に明らかになってきた。そこで、今回、有用成分の解析を目的に、標準品が入手可能であった 13 種

Table 1 LC-MS/MS condition

Parameter	Settings
<u>LC conditions</u>	
HPLC system	Agilent 1290 Infinity II LC system (Agilent Technologies)
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD (Agilent Technologies, 1.8 μ m, 2.1m \times 100mm)
Mobile Phase	A: 0.1 % formic acid in ultra pure water B: Methanol
Flow rate	0.2 mL/min
Gradient	(A % : B %) = 0 min (95 : 5) \longrightarrow 30 min (0 : 100)
Column temperature	40 °C
Injection volume	0.3 μ L
Run time	30 min
<u>MS conditions</u>	
MS system	Agilent 6495 B Triple Quadrupole LC/MS system (Agilent Technologies)
Ionization mode	Agilent Jet Stream (positive and negative mode)
Nebulizer pressure	345 kPa
Drying gas	20 L/min at 200 °C
Sheath gas	12 L/min at 400 °C
Capillary voltage	4000 V
Nozzle voltage	0 V
Analysis mode	Multiple reaction monitoring (MRM)

類のフェノール化合物とハトムギに特徴的なアルカロイド化合物であるコイキソールの分析を液体クロマトグラフィ / 質量分析法 (LC-MS) を用いて行ったので報告する。

材料・方法

1. 試料

CRD は、株式会社 CRD から提供されたものを用いた。また、対照として用いたハトムギ子実熱水抽出エキスは一般小売店で販売されているものを使用した。ハトムギ全粒粉およびハトムギ子実粉は自作した。

2. 試薬

標準品はプロトカテク酸 (Protocatechuic acid), カフェイン酸 (Caffeic acid), バニリン (Vanillin), ケルセチン (Quercetin), ナリンゲニン (Naringenin), トリシン (Tricin) 及びルテオリン (Luteolin) は富士フィルム和光純薬株式会社製を使用した。また、クロロゲン酸 (Chlorogenic acid), *p*-ヒドロキシベンズアルデヒド (*p*-Hydroxybenzaldehyde), シリングアルデヒド (Syringaldehyde), *p*-クマール酸 (*p*-Coumaric acid), フェルラ酸 (Ferulic acid) および *trans*-コニフェリルアルデヒド (*trans*-Coniferylaldehyde) は Merck 株式会社製を使用した。コイキソール (Coixol:6-Methoxy-2-benzoxazolinone) は Chem-Impex International, Inc. 製を使用した。

標準品は標準品粉末 5.0 mg を精密に秤量し、メタノールで 50 mL に定容して標準原液 (100 μ g/mL) とした。各標準原液 500 μ L を混合し 10 % アセトニトリル / 90 % 水で 50 mL に定容し、1 μ g/mL 混合標準液を調製した。LC/MS 用メタノール及び LC/MS 用超純水は富士フィルム和光純薬株式会社製を使用した。

3. 器具

試料抽出は Agilent Technologies 製 Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キット及び PTFE 製 Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルター (4 mm, 0.45 μ m) を使用した。遠心分離機は日立工機株式会社製を使用した。

4. 装置及び分析条件

装置及び分析条件は Table 1 に示した。

5. 試料前処理

試料はそのまま 1 g を精密に秤量し、水 10 mL を遠沈管 (50 mL) に加えて懸濁させた。その後、アセトニトリル 10 mL を加えて、手で 1 分間振盪抽出した。更に Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットの塩 (4 g 硫酸マグネシウム, 1 g 塩化ナトリウム, 1 g クエン酸ナトリウム及び 0.5 g クエン酸二ナトリウムセスキ水和物) を添加し、手で 1 分間振盪した。遠沈管を 4,000 \times g で 5 分間遠心分離して得られた上層 1 mL を正確に量り採り、水で 10 mL に定容し 0.45 μ m のシリンジフィルターでろ過後試験溶液とした。

Table 2 MRM condition for test compounds

Peaks	Compound	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Polarity
1	Protocatechuic acid	5.32	153	109	10	Negative
2	Chlorogenic acid	8.08	355	163	10	Positive
3	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	8.56	123	77	25	Positive
4	Caffeic acid	8.93	179	135	15	Negative
5	Vanillin	9.94	153	93	10	Positive
6	Syringaldehyde	10.67	183	123	10	Positive
7	<i>p</i> -Coumaric acid	11.13	163	119	10	Negative
8	Ferulic acid	11.97	195	177	5	Positive
9	Coixol	12.44	166	95	25	Positive
10	<i>trans</i> -Coniferyl aldehyde	12.54	179	149	10	Positive
11	Quercetin	17.09	303	153	40	Positive
12	Naringenin	17.3	273	153	25	Positive
13	Luteolin	17.76	287	153	35	Positive
14	Tricin	19.45	329	299	25	Negative

* MRM: Multiple Reaction Monitoring (多重反応モニタリング)

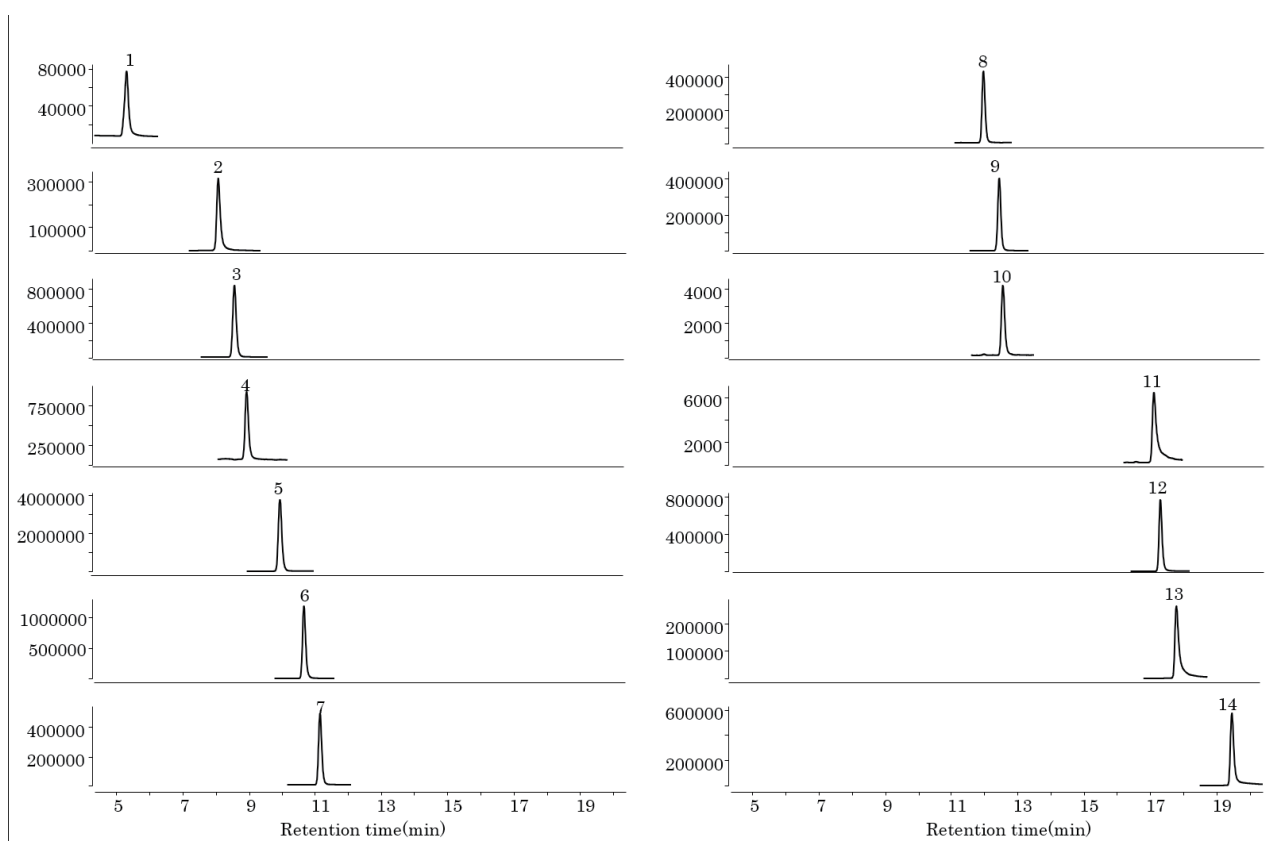


Fig.1. MRM chromatograms of test compounds. See table 2. for peak identification.

結果

I 測定条件の検討

1.1 LC-MS/MS 分析条件の検討

今回分析対象とした化合物について改良型 ESI イオン源 (AJS) を用いてスキャンモードでマススペクトルの測定

を行った。その結果、すべての化合物で正イオンモードの場合はプロトン化分子 $[(M+H)^+]$ 、負イオンモードの場合は脱プロトン化分子 $[(M-H)]^-$ がベースピークイオンとして観察された。そこで、これらイオンをプリカーサーイオンとして選択反応モニタリング (Selected reaction

Table 3 Sensitivities and linearities for test compounds

Peaks	Compounds	Detection limits (S/N=3 at 10 ng/mL)	Coefficient of determinations (1~500 ng/mL)
1	Protocatechuic acid	3.000	0.9999
2	Chlorogenic acid	0.215	0.9996
3	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	0.145	0.9990
4	Caffeic acid	2.500	0.9998
5	Vanillin	0.235	0.9983
6	Syringaldehyde	0.040	0.9994
7	<i>p</i> -Coumaric acid	0.305	0.9996
8	Ferulic acid	0.375	0.9981
9	Coixol	0.055	0.9982
10	<i>trans</i> -Coniferylaldehyde	3.000	0.9981
11	Quercetin	3.750	0.9989
12	Naringenin	0.110	0.9990
13	Luteolin	0.100	0.9992
14	Tricin	0.020	0.9996

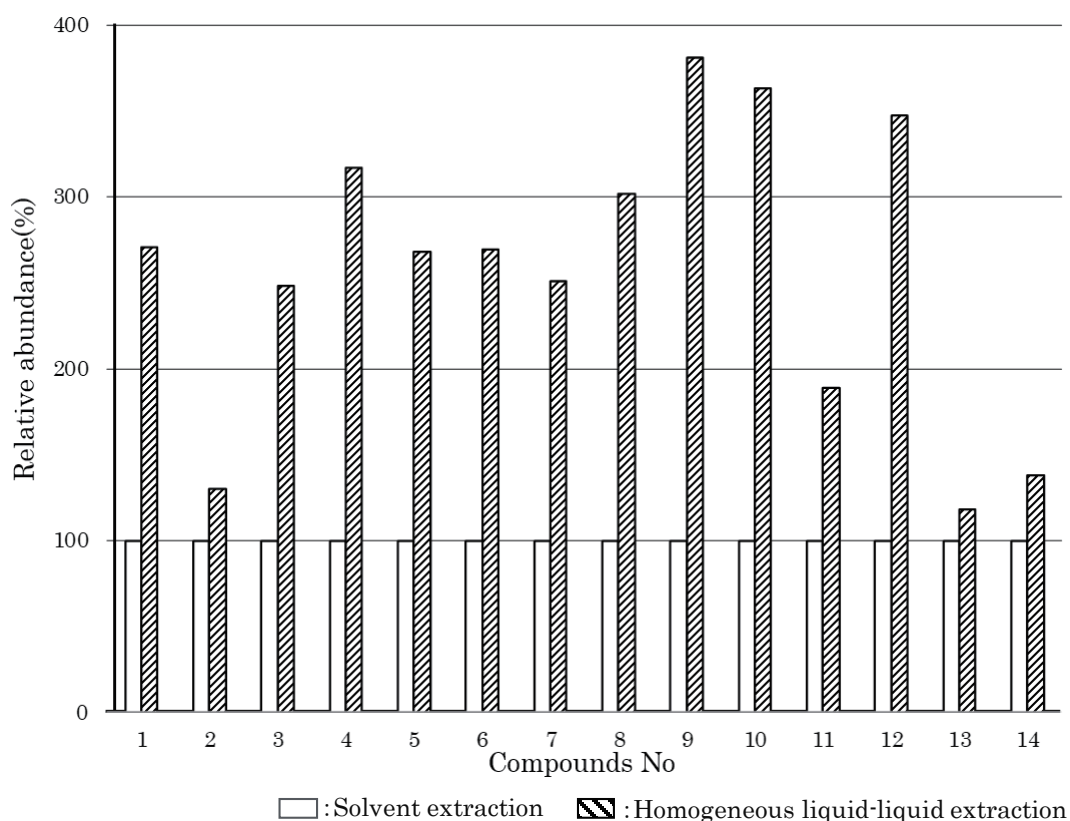


Fig.2. Recoveries of test compounds by different extraction method.
See table 2. for compounds No.

monitoring; SRM) 法の最低化を行い、最大感度を示した2つのプロダクトイオンを選択した (Table 2).

次に LC 条件の検討を行った。今回、対象とした化合物

は主にフェノール化合物で水酸基を有した化合物である。従って移動相には A 液に 0.1 % ギ酸水溶液, B 液にアセトニトリル及びメタノールを用いて検討を行った。その結

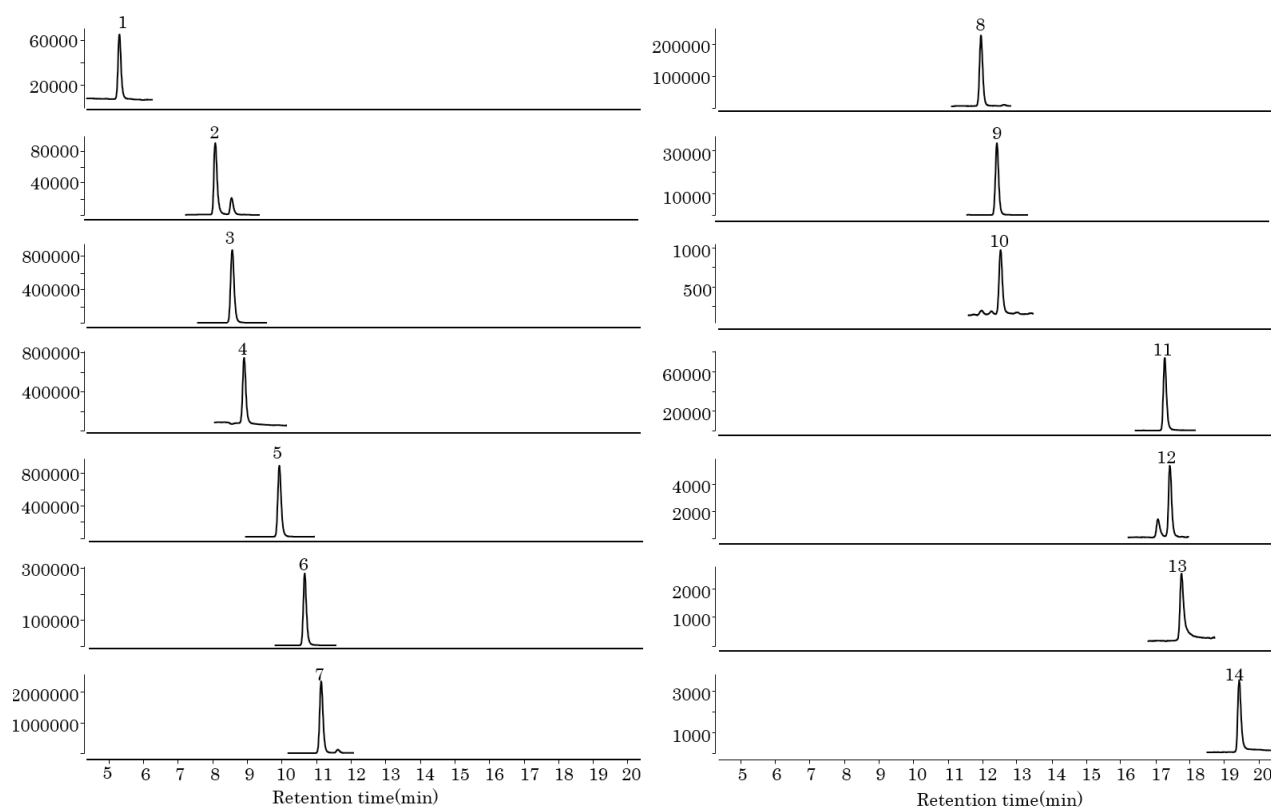


Fig.3. MRM chromatograms of test compounds in Coix-seed Reactive Derivatives (CRD).
See table 2. for peak identification.

果, アセトニトリルを用いた場合, 保持の弱い化合物の保持時間が早く, 分離が悪かった. 一方, メタノールを用いた場合, Table 1 に示したグラジエント条件で Fig.1 のクロマトグラムが得られ, 全化合物の分離が可能であった.

1.2 検量線及び定量下限

各化合物について 1 ~ 500 ng/mL の濃度範囲で作成した検量線の決定係数 r^2 は全ての化合物で 0.998 以上であった. また, $S/N=3$ を検出下限とした化合物の検出下限は 0.02 ~ 3.75 ng/mL であった (Table 3).

2 試験溶液調製法の検討

ハトムギ試料から分析対象化合物の抽出は直接溶媒抽出と純水で溶解し, 均一液抽出法で比較を行った. 抽出溶媒はアセトニトリルを使用した. 溶媒抽出法は試料を精密に 1 g 秤量し, 遠沈管 (50 mL) でアセトニトリル 10 mL で振盪抽出した. 抽出液を 4,000×g で 5 分間遠心分離して得られた上層 1 mL を正確に量り採り, 水で 10 mL に定容し 0.45 μ m のシリンジフィルターでろ過後試験溶液とした.

均一液抽出法は実験方法 5 に記述した通りである. 分析結果は Fig.2 に示した. このグラフは溶媒抽出法の強度を 100 とした相対強度を示した. 均一液抽出法は全ての化合物で強度が高く化合物の相対強度は 118 ~ 381 % であった. 従って, 試料前処理には水溶解, 均一液抽出法

を使用することとした.

3 CRD の分析

3.1 CRD のクロマトグラム

本試験法で CRD の測定を行った. 対照としてハトムギ子実エキス, ハトムギ全粒粉砕粉およびハトムギ子実粉砕粉を測定した. Fig.3 は CRD の Multiple Reaction Monitoring (MRM: 多重反応モニタリング) クロマトグラムを示した. ピーク 2 のクロロゲン酸とピーク 12 のナリンゲニンのピーク付近に試料由来のピークが観察されたが, これらは測定化合物の異性体と考えられる. その他, 化合物のクロマトグラム付近にはピークは観察されず, フェノール化合物の選択性の高いクロマトグラムが得られた.

3.2 マトリックス効果

エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) を使用した LC-MS を用いた場合, 測定化合物以外の試料成分がイオン化し, 測定化合物のイオン化を阻害することで測定値に誤差が生じる現象がある. そこで各試料抽出液をメタノールで 2, 5, 10 倍希釈し測定を行った. 試料抽出液を希釈した場合, 試料成分量が低下しイオン化阻害が低減され希釈倍率に比例して測定成分強度が低下しない. 結果は今回測定した試料中全測定化合物で希釈倍率に比例して強度が低下した. 従って, 試料抽出液中でのイオン化阻害はないと考

Table 4 Content levels of test compounds in samples

Peaks	Compounds	A		B		C		D	
		Content ($\mu\text{g/g}$)	RSD	Content ($\mu\text{g/g}$)	RSD	Content ($\mu\text{g/g}$)	RSD	Content ($\mu\text{g/g}$)	RSD
1	Protocatechuic acid	31.9	7.5	6.4	7.7	21.7	7.1	1.1	7.1
2	Chlorogenic acid	11.3	6.8	ND	5.4	7.4	6.2	ND	6.5
3	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	50.2	5.5	1.1	5.1	21.8	5.6	0.9	6.1
4	Caffeic acid	36.9	6.8	11.4	4.8	5.0	4.9	1.2	5.8
5	Vanillin	9.2	7.3	0.4	6.1	3.2	5.3	0.3	5.2
6	Syringaldehyde	12.1	6.4	0.4	6.3	5.2	5.1	0.2	6.7
7	<i>p</i> -Coumaric acid	275.0	5.7	8.2	5.1	68.2	5.8	1.8	6.8
8	Ferulic acid	27.1	6.1	8.1	4.9	5.2	6.3	2.3	5.9
9	Coixol	5.5	4.8	0.8	7.0	4.3	6.9	3.0	6.4
10	<i>trans</i> -Coniferylaldehyde	9.1	6.1	ND	6.1	5.7	6.4	0.1	4.9
11	Quercetin	16.2	5.8	0.9	5.5	14.9	5.8	0.2	5.3
12	Naringenin	11.1	6.2	ND	4.9	9.8	4.8	ND	5.0
13	Luteolin	0.5	7.1	ND	5.6	0.3	5.1	ND	5.8
14	Tricin	0.7	6.8	ND	6.3	0.3	5.5	ND	6.7

A: Coix-seed Reactive Derivatives (CRD)

B: Hot water extract of grain (a commercial product)

C: Wholemeal powder of *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf (powder of husk, pellicle, astringent skin, grain)

D: Powder of polished grain

えられる。

3.3 試料中含有量

それぞれの試料において、試験化合物の含有量は $n=5$ で測定を行った。Table 4 に平均含有量と相対標準偏差 (RSD: relative standard deviation) を示した。ハトムギ CRD エキス中フェノール化合物の含有量は *p*-クマル酸が最も高く、平均 275 $\mu\text{g/g}$ でその他化合物と比較して突出していた。また、対照のハトムギ全粒粉でも同様の傾向であった。一方、対照のハトムギ子実熱水抽出エキス及びハトムギ子実粉ではその他化合物と含有量の違いは小さかったことから、少なくとも *p*-クマル酸は穀由来と考えられる。ハトムギ由来コイキシロールは平均 5.5 $\mu\text{g/g}$ で 14 化合物中では低い含有量であった。また、その他試料と含有量の違いは小さかった。抗ウイルス機能性成分として注目されているトリシンは含有量が最も低く平均 0.7 $\mu\text{g/g}$ であった。その他試料中ではハトムギ全粒粉中 0.3 $\mu\text{g/g}$ であったが、ハトムギ子実エキス及びハトムギ子実粉では不検出であった。試料間の比較では、コイキシロール以外の化合物では、CRD が最大含有量であった。

考 察

本研究により、CRD には、様々な天然フェノール化合物が含有されていることが初めて明らかとなった。なかでも含有量が最も多い *p*-クマル酸 (*p*-Coumaric acid: PCA) は含有量からみて、機能性成分として最も重要であると思われる。そこで、CRD を含め、ハトムギが有する様々な機能性が、PCA の生物作用で説明できるのか、または 2 番目に多い *p*-Hydroxybenzaldehyde の生物作用に関与したものなのかについて、若干の文献的考察を加えたい。

ハトムギの穀実の構造は、内側から子実 (grain)、渋皮 (astringent skin)、薄皮 (pellicle)、外殻 (husk もしくは hull) から成る^{1,2)}。ハトムギを料理に用いる場合や漢方薬ヨクイニンの原料である精白粒 (polished grain) を得るためには、脱穀作業が行われる。その際にできるのがハトムギ糠 (bran) である。近年、我が国ではハトムギ糠の味や効能に注目が集まり、糠床の研究も精力的に行われている³⁾。ここでいう糠床とは、渋皮と削られた子実の最外層部分から成り、薄皮や硬い外皮はほとんど含まれていない。諸外国の論文でよく bran (糠) と表現されている部位も、やはり薄皮や外殻を含んでいないと解される。なお、外殻は通常 hull と表現して発表している研究者がほとんどである。また、論文で hull と表現してある場合は、薄皮を含んでいないと解釈して間違いはないと思われる。なお、薄皮は、大変軽く、脱穀の際、空気と共に容易に機外に吹き出されてしまい、例えば、実験用に大量の薄皮のみを集めるのはなかなか難しいのである。

CRD は、ハトムギ全粒を特殊製法を用いて熱水抽出したエキスで、子実、渋皮、薄皮、外殻の有用成分が包含されている点で、精白粒のエキス (漢方名: ヨクイニン) とは大きく異なっている。すなわち CRD の原料は、子実 (grain)、糠 (bran) 以外に薄皮 (astringent skin) や外殻 (hull または husk) をも含んでいる。今回、PCA は対照群と比較して CRD に多く検出できたことから、ハトムギにおいて、PCA は精白粒には少なく、糠や外殻に多く存在していると思われた。橋爪らは、清酒醸造用日本産米の PCA 含有量の分析を行い、PCA の含有量は玄米で 49 ~ 100 mg/kg と 70 % 精白米の 0.4 ~ 3.5 mg/kg より格段に多いことを報告しており³⁾、胚乳部には PCA が少ないことを指摘している。また、Zhao らは、ハトムギ糠 (子実外側と渋皮)

には遊離フェノール類としてPCAとクロロゲン酸を、結合型フェノール類としてPCAとフェルラ酸を検出している⁴⁾。さらに、PCAは強いラジカル捕捉作用とともに、キサンチンオキシダーゼ阻害作用を有し、げっ歯類においてオキソナート(oxonate)誘発高尿酸血症を改善すると報告している⁴⁾。現在、ハトムギが高尿酸血症に有効であるとするデータはないが、これは興味深い研究報告だと思われる。

今回は測定しなかったが、ハトムギ糠の有機溶媒抽出物にはフラボノイドであるタンゲレチン(Tangeretin)、ノビレチン(Nobiletin)のほか、*p*-ヒドロキシ安息香酸(*p*-Hydroxybenzoic acid)が検出され、これらがハトムギ糠中の抗炎症物質であるとしている⁵⁾。さらに、ハトムギ糠は、マウスにおいてTh1/Th2の免疫バランスを整え、アレルギー反応を抑える働きがあることも報告されている⁶⁾。我々は、臨床例で、CRDがアトピー性皮膚炎や接触皮膚炎など皮膚アレルギー疾患に有用なことや⁷⁾、健康成人においてはTh2の減少をもたらす、Th1/Th2値は相対的に上昇することを報告している⁸⁾。この作用にはハトムギ糠中の成分が関与していると考えられる。また、ハトムギ糠はヒスタミン遊離を抑制するとの報告もある⁹⁾。このようにハトムギ糠の抗炎症・抗アレルギー作用についてはいくつか報告がなされている¹⁰⁾。

一方、PCAのすぐれた抗炎症作用については、関節炎モデルマウス¹¹⁾、ラット炎症モデル¹²⁾、リウマチ¹³⁾、ラット軟骨細胞¹⁴⁾に関して報告されている。たしかに、ハトムギは古来、リウマチ患者が利用してきた歴史があるので、PCAを多く含有するCRDは補助療法として応用できるか否かを検討するべきかもしれない。また、我々が以前報告したCRDの抗炎症作用¹⁵⁾についても、PCAで説明できるかもしれない。なお、PCAが抗酸化作用を有することも報告されている^{16,17)}。

ハトムギの抗腫瘍、がん予防効果については数多くの報告がある。中国ではハトムギの精白粒の有機溶媒抽出により抗がん剤(Kanglaite)が開発され、すでに数十万人に使用されている²⁾。ハトムギ糠は精白粒と比較し、AGS胃癌細胞株の増殖をより抑制したとの報告もある¹⁸⁾。さらに、ハトムギ糠はMCF-7、MDA-MB-231、T-47Dなどの乳癌細胞の増殖を抑制し¹⁹⁾、大腸前癌病変への効果も報告されている^{20,21)}。また、我々は、CRDの癌化学予防効果について報告した¹⁵⁾。一方、PCAでも抗腫瘍効果や癌化学予防作用についても報告がみられる²²⁻²⁶⁾。以上のことから、CRDの抗腫瘍作用には、PCAも関与している可能性が高いと思われる。

ハトムギと肝臓に関する文献は見当たらないが、PCAはMAPKsとNrf2シグナリングを強化し、アポトーシスを阻害することによる顕著な肝臓保護作用を示すことが報告されている²⁷⁾。また、ハトムギと心臓に関する文献も見当たらないが、PCAは酸化ストレスを軽減することにより、心筋梗塞の際のアポトーシスを軽減することがラットの実験で

示されている²⁸⁾。また、LPS誘発肺炎に引き続く心臓の損傷を軽減することが動物実験で報告されている²⁹⁾。

わが国では浮腫や腎機能の改善を期待して、透析患者やネフローゼ症候群の患者によくヨクイニンを処方した時代はあったが、最近、続報は見当たらない。しかし、PCAは動物実験で、抗癌剤、糖尿病、毒性物質などによる腎機能障害を軽減する報告があるので³⁰⁻³³⁾、CRD摂取による腎機能の推移については今後検討したいと考えている。

PCAは、脳の保護作用³⁴⁻³⁶⁾がいくつか報告されており、とくに鬱³⁷⁾や記憶障害の改善作用³⁸⁾は注目される。現在、CRDを含むハトムギの脳機能に及ぼす影響については報告が少ないので、今後はPCAの作用を参考に臨床例を集積するべきであろう。PCAは、その他、抗菌作用³⁹⁾、抗真菌作用⁴⁰⁾、歯周病の予防⁴¹⁾、胃保護作用⁴²⁾、肺の炎症保護作用⁴³⁾、血小板凝集能低下作用⁴⁴⁾が報告されているが、これらはいずれもハトムギの生物作用では未だ指摘されていないものである。

ハトムギはマウスの実験において骨粗鬆症に有効であるとする報告があった⁴⁵⁾。メカニズムとしては、骨芽細胞の増殖促進作用⁴⁶⁾にあると考えられている。興味深いことに、PCAには、破骨細胞の増殖抑制ならびに骨成長の刺激作用が見つかっている^{47,48)}。これらは、何らかの関係があるとみてよいだろう。

司馬遷の「史記」(紀元前1世紀)には、最古の王朝である夏の建国者である兎の母が、ハトムギを愛飲して、兎を身籠ることができたとの記載があるが、近年になり、ハトムギの卵胞成熟や排卵を促進する有用成分として、*trans*-stigmastanolが単離されている²⁾。

一方、PCAは劇的に血中プロラクチン濃度を下げる作用が発見されているので⁴⁹⁾、この作用も排卵誘発に優位に働くと考えられる。

我々はこれまで、CRDが皮膚の色素沈着を軽減させることをいくつか報告し⁵⁰⁻⁵²⁾、その作用機序は今一つはっきりとはしないとしてきたが、今回の試験により、最も含有量の多いPCAの作用が重要であると思われた。PCAはクリームとして、皮膚に塗布するとUV照射後の紅斑や色素沈着を強力に阻止する働きがあることが報告されている⁵³⁾。また、PCAは強力なチロシナーゼ阻害作用を有し⁵⁴⁾、皮膚に透明感をもたらすことも報告されている⁵⁵⁾。今回測定でCRD中のPCAの量は、275 μ g/gであったが、これはCRDの1日摂取目安量2gで換算すると、0.55 mg/日とかなり少ない量であることがわかる。しかし、他の含有フェノール化合物もメラニン生成抑制作用を有している。まず、2番目に含有量が多い

p-Hydroxybenzaldehydeはチロシナーゼ阻害作用を有している⁵⁶⁾、さらに、フェルラ酸⁵⁷⁾、カフェイン酸⁵⁷⁾、プロトカテク酸^{58,59)}、ケルセチン⁶⁰⁾、クロロゲン酸⁶¹⁾、トリシン⁶²⁾もメラニン生成を抑制するという報告がある。ナリンゲニンについては、メラニンを抑制するという報告⁶³⁾と刺激する⁶⁴⁾という相反する作用が報告されている。一方、ハ

トムギから単離された 2-O- β -glucopyranosyl-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one と coixol にも色素生成阻止作用が報告されている⁶⁵⁾。以上のことから、CRD は PCA, *p*-Hydroxybenzaldehyde, フェルラ酸, カフェイン酸, プロトカテク酸, ケルセチン, クロロゲン酸, トリシンなどのフェノール化合物の他, コイキソールを含め, 計 9 種類もの化合物の相乗作用の結果, 色素沈着が軽減すると考えられる。

Stratifin(SFN) は, 表皮角化細胞において産生され, 表皮における細胞周期の進行停止やアポトーシスの誘導だけでなく, 真皮におけるコラーゲン産生にも関与し, 皮膚老化に深く関与していると考えられる。PCA は, Stratifin を減弱させることにより, 皮膚の間質の老化を制御している可能性も指摘されている⁶⁶⁾。

PCA の次に含有量の多かった *p*-Hydroxybenzaldehyde について若干の考察を加えたい。ハトムギ子実のエキスは, 寄生虫トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) の活動を静止させる働きを有していることがわかっていた⁶⁷⁾。これは, エキス中の何らかの成分がマクロファージを活性化させて起きる現象であるとは推察されていたが, 詳細は不明であった。ところが, 最近, *p*-Hydroxybenzaldehyde の作用であることが分かった⁶⁸⁾。

CRD は, たとえば手湿疹などに生じた皮膚の亀裂を短期間に修復する作用を有しているが, そのメカニズムは不明であった。しかし, 最近, *p*-Hydroxybenzaldehyde が, ケラチノサイトの移動と創傷癒合を促進することが判明している⁶⁹⁾, この化合物が関与している可能性が高いと思われた。

高脂肪食を摂取させたマウスに, ハトムギエキスを投与すると, 内臓脂肪が減少し, 体重増加が停止し, 血中中性脂肪やコレステロールの減少, 脂肪肝の改善をみることが報告され, PPAR γ と C/EBP α のダウンレギュレーションによるものであると説明されていた⁷⁰⁾, 有効物質は今一つはっきりとはしていなかった。ところが, *p*-Hydroxybenzaldehyde と Vanillin がインスリン抵抗性を改善することが報告されている⁷¹⁾, これらの化合物の関与も視野に入れるべきだと考えた。

ハトムギの最外層の外殻の有用成分についてであるが, 前述した糠というのは, ハトムギ穀実を粉碎し, 外殻と薄皮を除去したものを, すなわち渋皮付きハトムギを脱穀した際にできた残渣物, つまり渋皮と子実の最外層から成る。ここで言う外殻とは, 薄皮のさらに外側の非常に硬い殻の事である。Cken らは, ハトムギ外殻から *p*-Hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde, *trans*-Coniferylaldehyde, Sinapaldehyde, および Coixol など 6 種類の化合物を検出し, なかでも *trans*-coniferylaldehyde が癌化学予防剤として最も有望であるとしている⁷²⁾。また, Huang らは, ハトムギ外殻は抗炎症作用を有していることを見出し, Eriodictyol, Ceramide (2S,3S,4R)-2-[(2'R)-2'-hydroxytetracosanoyl-amino]-1,3,4-octadecanetriol, な

らびに PCA を検出したうえで, Eriodictyol とセラミドがこの抗炎症活性の要だとしている⁷³⁾。また, Kuo らは, ハトムギ外殻から強い抗酸化能を有する化合物を同定した。化合物は合計で 6 種類検出され, それぞれ Coniferyl alcohol, Syringic acid, Ferulic acid, Syringaresinol, 4-Ketopinonesinol, ならびに新しいリグナン (Lignan) である Mayuenolide であった⁷⁴⁾。さらに, Hsia らは, ハトムギ外殻の抽出物は, 子宮筋の収縮を抑え, 月経困難症の治療に応用できる可能性がある⁷⁵⁾。Kuo らは, 外殻のメタノール抽出物は多様な抗酸化能を有し, 抗腫瘍効果を有していると報告した⁷⁶⁾。

CRD はハトムギ精白粒の成分はもちろん, 糠 (子実最外層と渋皮), 薄皮や外殻の様々な有用成分を含有している。また, CRD のさらなる機能性探求には, 今後フェノール化合物以外の有用成分の同定が不可欠であると考えられた。

結 論

試料を純水溶解で溶解し, アセトニトリルと塩で相分離抽出した抽出液を直接 LC-MS/MS で分析を行う迅速な分析法を開発した。また, 本分析法で CRD ならびに対照物として, ハトムギ全粒粉, ハトムギ子実エキスおよびハトムギ子実粉中の, 13 種類のフェノール化合物とアルカロイド化合物であるコイキソールの含有量を測定した。結果は, CRD はその他対照物と比較して明らかに含有量が高い値を示した。特に *p*-クマル酸と *p*-ヒドロキシベンズアルデヒドは高値であった。以上のことから, CRD が有する多様な生物作用には, 糠や外殻に含まれているフェノール化合物が深く関与していることが推察された。

助成元

なし

利益相反

本試験に用いたハトムギ全粒熱水抽出エキス (CRD) は著者鈴木信孝らが設立した大学発ベンチャー企業 (株) CRD の研究開発食品である。

参考文献

- 鈴木信孝. ハトムギの食品としての機能性と有用性. 特産種苗. 2009;3:20-24.
- 鈴木信孝. ハトムギと健康体質. FOOD STYLE 21. 2014; 18(6):57-61.
- 木村 洋, 渡邊 正一, 波多野 淳子ら. 鳩麦糠からの糠床調製および米糠床との比較. 日本食品科学工学会誌. 2020; 67(1):35-43.
- Zhao M, Zhu D, Sun-Waterhouse D, et al. In vitro and

- in vivo studies on adlay-derived seed extracts: phenolic profiles, antioxidant activities, serum uric acid suppression, and xanthine oxidase inhibitory effects. *J Agric Food Chem.* 2014;62(31):7771-7778.
- 5) Huang DW, Wu CH, Shih CK, et al. Application of the solvent extraction technique to investigation of the anti-inflammatory activity of adlay bran. *Food Chem.* 2014; 145:445-453.
 - 6) Hsu HY, Lin BF, Lin JY, et al. Suppression of allergic reactions by dehulled adlay in association with the balance of TH1/TH2 cell responses. *J Agric Food Chem.* 2003;51(13):3763-3769.
 - 7) 鈴木信孝, 許鳳浩, ハトムギ全粒熱水抽出エキス: 事例研究. *日本補完代替医療学会誌.* 2018;15(2):127-132.
 - 8) 鈴木信孝, 許鳳浩, 上馬場和夫ら. Coix-seed Reactive Derivatives (CRD) の Th1/Th2 バランスに与える影響. *日本補完代替医療学会誌.* 2018;15(2):113-116.
 - 9) Chen HJ, Lo YC, Chiang W. Inhibitory effects of adlay bran (*Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf*) on chemical mediator release and cytokine production in rat basophilic leukemia cells. *J Ethnopharmacol.* 2012; 141(1):119-127.
 - 10) Chen HJ, Chung CP, Chiang, et al. Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran. *Food Chem.* 2011;126(4): 1741-1748.
 - 11) Zhu H, Liang QH, Xiong XG, et al. Anti-Inflammatory Effects of p-Coumaric Acid, a Natural Compound of *Oldenlandia diffusa*, on Arthritis Model Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018 Feb 22;2018: 5198594.
 - 12) Pragasam SJ, Venkatesan V, Rasool M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation.* 2013;36(1):169-176.
 - 13) Neog MK, Joshua Pragasam S, Krishnan M, et al. p-Coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the rheumatoid arthritis rat model. *Biofactors.* 2017; 43(5):698-717.
 - 14) Huang X, You Y, Xi Y, et al. p-Coumaric Acid Attenuates IL-1 β -Induced Inflammatory Responses and Cellular Senescence in Rat Chondrocytes. *Inflammation.* 2019 Dec 10. doi:10.1007/s10753-019-01142-7.
 - 15) 鈴木里芳, 徳田春邦, 鈴木信孝ら. ハトムギの抗腫瘍ならびに抗炎症作用に関する検討. *日本補完代替医療学会誌.* 2013;10(2):75-85.
 - 16) Sabitha R, Nishi K, Gunasekaran VP, et al. p-Coumaric acid attenuates alcohol exposed hepatic injury through MAPKs, apoptosis and Nrf2 signaling in experimental models. *Chem Biol Interact.* 2020;321:109044.
 - 17) Mozaffari Godarzi S, Valizade Gorji A, Gholizadeh B, et al. Antioxidant effect of p-coumaric acid on interleukin 1- β and tumor necrosis factor- α in rats with renal ischemic reperfusion. *Nefrologia.* 2019 Dec 28. pii:S0211-6995(19)30193-6.
 - 18) Chung CP, Hsia SM, Lee MY, et al. Gastroprotective activities of adlay (*Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf*) on the growth of the stomach cancer AGS cell line and indomethacin-induced gastric ulcers. *J Agric Food Chem.* 2011;59(11):6025-6033.
 - 19) Chung CP, Hsu CY, Lin JH, et al. Antiproliferative lactams and spiroenone from adlay bran in human breast cancer cell lines. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(4):1185-1194.
 - 20) Li SC, Chen CM, Lin SH, et al. Effects of adlay bran and its ethanolic extract and residue on preneoplastic lesions of the colon in rats. *J Sci Food Agric.* 2011; 91(3):547-552.
 - 21) Chung CP1, Hsu HY, Huang DW, et al. Ethyl acetate fraction of adlay bran ethanolic extract inhibits oncogene expression and suppresses DMH-induced preneoplastic lesions of the colon in F344 rats through an anti-inflammatory pathway. *J Agric Food Chem.* 2010;58(13):7616-7623.
 - 22) Sharma SH, Rajamanickam V, Nagarajan S. Supplementation of p-coumaric acid exhibits chemopreventive effect via induction of Nrf2 in a short-term preclinical model of colon cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2019;28(6):472-482.
 - 23) Roy N, Narayanankutty A, Nazeem PA, et al. Plant Phenolics Ferulic Acid and P-Coumaric Acid Inhibit Colorectal Cancer Cell Proliferation through EGFR Down-Regulation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(8): 4019-4023.
 - 24) Shailasree S, Venkataramana M, Niranjana SR, et al. Cytotoxic effect of p-Coumaric acid on neuroblastoma, N2a cell via generation of reactive oxygen species leading to dysfunction of mitochondria inducing apoptosis and autophagy. *Mol Neurobiol.* 2015;51(1): 119-130.
 - 25) Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2013;19(43):7726-7734.
 - 26) Sharma SH, Chellappan DR, Chinnaswamy P, et al. Protective effect of p-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:577-588.
 - 27) Cha H, Lee S, Lee JH, et al. Protective effects of

- p-coumaric acid against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol.* 2018;121:131-139.
- 28) Stanely Mainzen Prince P, Roy AJ. p-Coumaric acid attenuates apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress. *Int J Cardiol.* 2013;168(4):3259-3266.
- 29) Kheiry M, Dianat M, Badavi M, et al. Does p-coumaric acid improve cardiac injury following LPS-induced lung inflammation through miRNA-146a activity? *Avicenna J Phytomed.* 2020;10(1):50-57.
- 30) Rafiee Z, Moaiedi MZ, Gorji AV, et al. p-Coumaric Acid Mitigates Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity Through Suppression of Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis. *Arch Med Res.* 2020;51(1):32-40.
- 31) Zabad OM, Samra YA, Eissa LA. P-Coumaric acid alleviates experimental diabetic nephropathy through modulation of Toll like receptor-4 in rats. *Life Sci.* 2019; Dec 1;238:116965.
- 32) Navaneethan D, Rasool MK. An experimental study to investigate the impact of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol, on cadmium chloride-induced renal toxicity. *Food Funct.* 2014;5(10):2438-2445.
- 33) Ekinici Akdemir FN, Albayrak M, Çalik M, et al. The Protective Effects of p-Coumaric Acid on Acute Liver and Kidney Damages Induced by Cisplatin. *Biomedicines.* 2017 Apr 28;5(2). pii:E18.
- 34) Li Y, Han J, Zhang Y, et al. Prophylactic effect and mechanism of p-coumaric acid against hypoxic cerebral edema in mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2019;260:95-104.
- 35) Sakamula R, Thong-Asa W. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in mice with cerebral ischemia reperfusion injuries. *Metab Brain Dis.* 2018;33(3):765-773.
- 36) Guven M, Aras AB, Akman T, et al. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(4):356-363.
- 37) Lee S, Kim HB, Hwang ES, et al. Antidepressant-like Effects of p-Coumaric Acid on LPS-induced Depressive and Inflammatory Changes in Rats. *Exp Neurobiol.* 2018;27(3):189-199.
- 38) Kim HB, Lee S, Hwang ES, et al. p-Coumaric acid enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;492(3):493-499.
- 39) Ojha D, Patil KN. p-Coumaric acid inhibits the *Listeria monocytogenes* RecA protein functions and SOS response: An antimicrobial target. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;517(4):655-661.
- 40) Morales J, Mendoza L, Cotoras M. Alteration of oxidative phosphorylation as a possible mechanism of the antifungal action of p-coumaric acid against *Botrytis cinerea*. *J Appl Microbiol.* 2017;123(4):969-976.
- 41) Bhattarai G, Min CK, Jeon YM, et al. Oral supplementation with p-coumaric acid protects mice against diabetes-associated spontaneous destruction of periodontal tissue. *J Periodontol Res.* 2019;54(6):690-701.
- 42) Costa P, Boeing T, Somensi LB, et al. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. *Biofactors.* 2019; 5(3):479-489.
- 43) Kim W, Lim D, Kim J. p-Coumaric Acid, a Major Active Compound of *Bambusae Caulis* in *Taeniam*, Suppresses Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation. *Am J Chin Med.* 2018;46(2):407-421.
- 44) Luceri C, Giannini L, Lodovici M, et al. p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. *Br J Nutr.* 2007;97(3):458-463.
- 45) Yang RS, Lu YH, Chiang W, et al. Osteoporosis Prevention by Adlay (*Yi Yi*: The Seeds of *Coix Lachryma-Jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) in a Mouse Model. *J Tradit Complement Med.* 2013;3(2):134-138.
- 46) Yang RS, Chiang W, Lu YH et al. Evaluation of osteoporosis prevention by adlay using a tissue culture model. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17 Suppl 1:143-146.
- 47) Neog MK, Rasool M. Targeted delivery of p-coumaric acid encapsulated mannosylated liposomes to the synovial macrophages inhibits osteoclast formation and bone resorption in the rheumatoid arthritis animal model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;133:162-175.
- 48) Lee JH, Chung YH, Kim HH, et al. p-Coumaric acid stimulates longitudinal bone growth through increasing the serum production and expression levels of insulin-like growth factor 1 in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;505(4):1103-1106.
- 49) Chowdhury M, Kabir SN, Pal AK, et al. Modulation of luteinizing hormone receptors: effect of an inhibitor of prolactin secretion, p-coumaric acid. *J Endocrinol.* 1983;98(3):307-311.
- 50) 鈴木信孝, 川島拓也, 許鳳浩ら. Coix-seed Reactive Derivatives (CRD) の皮膚色素沈着に与える影響に関する研究. 日本補完代替医療学会誌. 2018;15(2):85-90.
- 51) 鈴木信孝, 杉本勇人, 橋本慎太郎ら. Coix-seed Reactive Derivatives (CRD) 摂取が光老化皮膚の改善に有用であった事例報告. 日本補完代替医療学会誌. 2019;16(1):53-56.
- 52) 鈴木信孝, 杉本勇人, 橋本慎太郎ら. Coix-seed Reactive Derivatives(CRD) 摂取が有用であった摩擦性黒皮症の 1

- 例. 日本補完代替医療学会誌. 2019;16(1):57-60.
- 53) Seo YK, Kim SJ, Boo YC, et al. Effects of p-coumaric acid on erythema and pigmentation of human skin exposed to ultraviolet radiation. *Clin Exp Dermatol*. 2011;36(3):260-266.
- 54) Boo YC. p-Coumaric Acid as An Active Ingredient in Cosmetics: A Review Focusing on its Antimelanogenic Effects. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Aug 4;8(8).
- 55) Song K, An SM, Kim M, et al. Comparison of the antimelanogenic effects of p-coumaric acid and its methyl ester and their skin permeabilities. *J Dermatol Sci*. 2011;63(1):17-22.
- 56) Yi W, Cao R, Peng W, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 4-hydroxybenzaldehyde derivatives as tyrosinase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2010;45(2):639-646.
- 57) Maruyama H, Kawakami F, Lwin TT, et al. Biochemical Characterization of Ferulic Acid and Caffeic Acid Which Effectively Inhibit Melanin Synthesis via Different Mechanisms in B16 Melanoma Cells. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(5):806-810.
- 58) Truong XT, Park SH, Lee YG, et al. Protocatechuic Acid from Pear Inhibits Melanogenesis in Melanoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 21;18(8). pii: E1809. doi: 10.3390/ijms18081809.
- 59) Chou TH, Ding HY, Lin RJ, et al. Inhibition of melanogenesis and oxidation by protocatechuic acid from *Origanum vulgare* (oregano). *J Nat Prod*. 2010;73(11):1767-1774.
- 60) Fan M, Zhang G, Hu X, et al. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Res Int*. 2017;100(Pt 1):226-233.
- 61) Li HR, Habasi M, Xie LZ, et al. Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B16 melanoma cells. *Molecules*. 2014;19(9):12940-12948.
- 62) Mu Y, Li L, Hu SQ. Molecular Inhibitory Mechanism of Tricin on Tyrosinase. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2013;107:235-240.
- 63) Zhou J, Tang Q, Wu T, et al. Improved TLC Bioautographic Assay for Qualitative and Quantitative Estimation of Tyrosinase Inhibitors in Natural Products. *Phytochem Anal*. 2017;28(2):115-124.
- 64) Ohguchi K1, Akao Y, Nozawa Y. Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(6):1499-1501.
- 65) Amen Y, Arung ET, Afifi MS, et al. Melanogenesis inhibitors from *Coix lacryma-jobi* seeds in B16-F10 melanoma cells. *Nat Prod Res*. 2017;31(23):2712-2718.
- 66) Seok JK, Boo YC. p-Coumaric Acid Attenuates UVB-Induced Release of Stratifin from Keratinocytes and Indirectly Regulates Matrix Metalloproteinase 1 Release from Fibroblasts. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2015;19(3):241-247.
- 67) Soh CT, Kim SH, Kim KY, et al. Biostatic activity of *Coix lacryma* seed extract on *Toxoplasma gondii* in macrophages. *Korean J Parasitol*. 1996;34(3):197-206.
- 68) Lee J, Choi JW, Han HY, et al. 4-Hydroxybenzaldehyde Restricts the Intracellular Growth of *Toxoplasma gondii* by Inducing SIRT1-Mediated Autophagy in Macrophages. *Korean J Parasitol*. 2020;58(1):7-14.
- 69) Kang CW, Han YE, Kim J, et al. 4-Hydroxybenzaldehyde accelerates acute wound healing through activation of focal adhesion signalling in keratinocytes. *Sci Rep*. 2017 Oct 27;7(1):14192.
- 70) Choi EK, Cho YJ, Yang HJ, et al. *Coix* seed extract attenuates the high-fat induced mouse obesity via PPAR γ and C/EBP α downregulation. *Mol Cell Toxicol*. 2015;11:213-221.
- 71) Park S, Kim DS, Kang S. *Gastrodia elata* Blume water extracts improve insulin resistance by decreasing body fat in diet-induced obese rats: vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde are the bioactive candidates. *Eur J Nutr*. 2011;50(2):107-118.
- 72) Chen HH, Chiang W, Chang JY, et al. Antimutagenic constituents of adlay (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) with potential cancer chemopreventive activity. *J Agric Food Chem*. 2011;59(12):6444-6452.
- 73) Huang DW, Chung CP, Kuo YH, et al. Identification of compounds in adlay (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) seed hull extracts that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*. 2009;57(22):10651-10657.
- 74) Kuo CC, Chiang W, Liu GP, et al. 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from adlay (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) hulls. *J Agric Food Chem*. 2002;50(21):5850-5855.
- 75) Hsia SM, Kuo YH, Chiang W, et al. Effects of adlay hull extracts on uterine contraction and Ca²⁺ mobilization in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 295(3): E719-726.
- 76) Kuo CC, Shih MC, Kuo YH, et al. Antagonism of free-radical-induced damage of adlay seed and its antiproliferative effect in human histolytic lymphoma U937 monocytic cells. *J Agric Food Chem*. 2001;49(3): 1564-1570.

ABSTRACT

Analysis of Phenolic Compounds in Coix-seed Reactive Derivatives(CRD) by Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry(LC-MS)

Nobutaka SUZUKI¹, Masahiko TAKINO², Hirotaka OKUWA-HAYASHI³

¹ Department of Complementary and Alternative Medicine Clinical Research and Development,
Kanazawa University Graduate School of Medical Science

² Agilent Technologies Japan, Ltd.

³ Faculty of Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

To clarify the functions of Coix-seed Reactive Derivatives(CRD), we analyzed 13 kinds of phenolic compounds and coixol(an alkaloid) in CRD powder by using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry(LC-MS).The following are the results: *p*-Coumaric acid 275.0 ($\mu\text{g/g}$), *p*-Hydroxybenzaldehyde 50.2 ($\mu\text{g/g}$), Caffeic acid 36.9 ($\mu\text{g/g}$), Protocatechuic acid 31.9 ($\mu\text{g/g}$), Ferulic acid 27.1 ($\mu\text{g/g}$), Quercetin 16.2 ($\mu\text{g/g}$), Syringaldehyde 12.1 ($\mu\text{g/g}$), Chlorogenic acid 11.3 ($\mu\text{g/g}$), Naringenin 11.1 ($\mu\text{g/g}$), Vanillin 9.2 ($\mu\text{g/g}$), *trans*-Coniferylaldehyde 9.1 ($\mu\text{g/g}$), Tricin 0.7 ($\mu\text{g/g}$), Luteolin 0.5 ($\mu\text{g/g}$) and Coixol(6-Methoxy-2-benzoxazolinone) 5.5 ($\mu\text{g/g}$). CRD is composed of many substances other than these phenolic compounds. Therefore, further studies are needed to understand the various clinical features associated with CRD intake.

Key words: *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf, Coix-seed Reactive Derivatives, CRD, Liquid Chromatography/
Mass Spectrometry, LC-MS, Phenolic compounds, Polyphenols, Coixol