

Chart 2 Scheme for the Isolation of Triterpenes from the Fruiting Bodies of *G. lucidum*

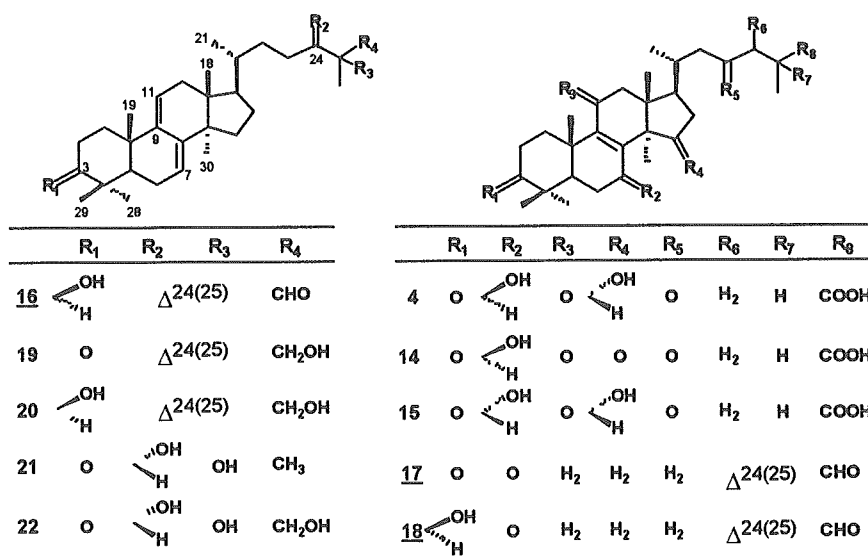


Fig. 2 Structures of Compounds Isolated from the Fruiting Bodies of *G. lucidum*

(3) 鹿角霊芝の子実体からトリテルペンアルコールの単離と同定

前2節で単離したトリテルペン類はアシド体が多く、アルコール体が少なかった。アルコール体を効率よく得るために、トリテルペン類を多く含む鹿角霊芝を用いて抽出を行った。鹿角霊芝の子実体をクロロホルムで加熱還流抽出後、シリカゲルとフロリジルカラムクロマトグラフ

イー及び分取用高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を繰り返すことにより分画精製し、5種のトリテルペンアルコール(20, 22-25)と1種のエルゴステロール類(26)を単離した(Chart 3)。これらの化合物の構造は<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>CNMRによりそれぞれ ganodermatriol (23), ganoderiol F (24), lucidumol B (25), ergosterol (26)と同定した(Fig. 3)。

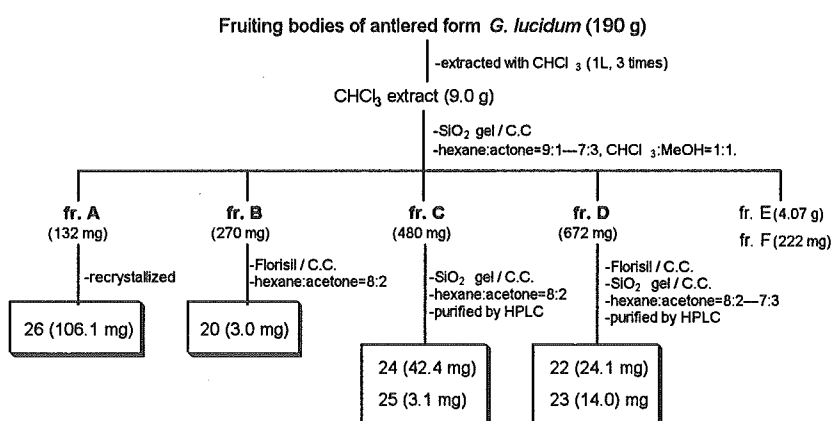


Chart 3 Scheme for the isolation of triterpenes from Antlered Form Fruiting Bodies of *G. lucidum*

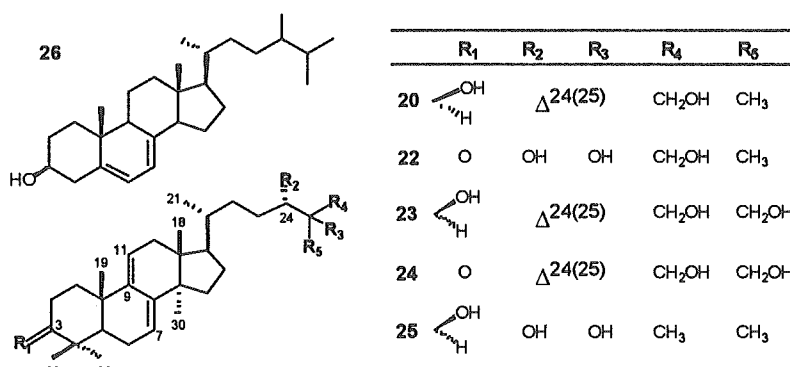


Fig. 3 Structures of Compounds Isolated from the Antlered Form Fruiting Bodies of *G. lucidum*

### 3. 酸化防止剤等の品質評価法に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 17 年度分担研究報告書

天然添加物の抗酸化活性評価法に関する研究

分担研究者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

協力研究者 尹 永淑 東京薬科大学生命科学部 助手

研究要旨

各種天然添加物製品の抗酸化活性を簡便かつ迅速に評価する方法の開発を目的として、 $\beta$ -カロテン退色法、DPPH 法、WST 法の 3 つを適用し、酸化防止剤または抗酸化活性を持つと思われる各種食品添加物の活性を測定した。各品目の抗酸化活性をいずれの方法でも簡便に測定することができたが、測定方法によって活性強度の傾向が異なる品目があることがわかった。

A. 研究目的

食品には様々な種類の酸化防止剤が利用されているが、近年、合成酸化防止剤に代わり、天然起源の酸化防止剤の使用が消費者に好まれる傾向にある。また、天然の抗酸化物質が「体によい」というイメージが広まり、抗酸化活性（フリーラジカルおよびスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性（SOSA））をもつとされる天然添加物が健康食品素材として用いられることも多く、その使用量が増加している。しかし、天然添加物製品の多くは混合物であるため、その抗酸化活性に関する情報は、基原植物あるいは単一の主成分の活性に関する文献を引用するのみである場合が多い。そこで、各種天然添加物製品の抗酸化活性を簡便かつ迅速に評価する方法の開発を目的として、 $\beta$ -カロテン退色法、DPPH 法、WST 法

の 3 つを適用し、各添加物品目の活性を測定した。

B. 研究方法

1. 試料および試薬：天然添加物は、日本食品添加物協会を通じて入手したものを用いた。一部は、添加物と本質が同等と推測される市販試薬で代用した。使用した試料（22 品目）は表に示した。
3. 抗酸化活性の測定：
  - 1)  $\beta$ -カロテン退色法：各試料を 50%EtOH に溶かして 1mg/ml とし、美甘らの方法<sup>1)</sup>を改良してリノール酸化阻害率を測定した。
  - 2) DPPH 法：各試料を EtOH に溶かして 10 $\mu$ g/ml とし、DPPH（1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル）ラジカル消去率を測定した。
  - 3) WST 法：各試料を 2%DMSO に溶かし

て 10 $\mu$ g/ml とし、受田らの方法<sup>2)</sup>によりスーパーオキシドアニオンラジカル阻害率を測定した。

- 4) ESR 法：既報<sup>3)</sup>と同様な方法で測定した。

なお、活性はすべて%で表し、100%のとき完全に抑制または消去したことを表す。

### C. 結果および考察

各種食品添加物の抗酸化活性を測定した結果を表に示した。 $\beta$ -カロテン退色法は、リノール酸自動酸化抑制活性を測定するものであり、特に食品中の油脂の酸敗を抑制するモデルと見なせる。本法では、BHT、BHA、エラグ酸、クエルセチン、ルチン酵素分解物（主成分はイソクエルシトリン）、チャ抽出物（主成分はカテキン類）、ブドウ種子抽出物（主成分はプロアントシアニジンとされている）、タンニン、テンリョウチャ抽出物（主成分はタンニンとされている）、トコフェロールに高い活性が認められた。また、フリーラジカル消去活性が簡易・迅速に測れる方法である DPPH 法により活性を測定したところ、没食子酸、没食子酸プロピル、エラグ酸、クエルセチン、タンニンに高い活性が認められた。 $\beta$ -カロテン退色法で高い値を示したものでも低い値を示すものがあった。次に、SOSA 測定には、受田らにより開発された WST-1 法を適用した。本法は原理的には NBT 法と同等であるが、発色プローブとして WST-1 を用い、NBT 法の欠点を克服した迅速な方法である。WST 法による SOSA は、没食子酸プロピル、没食子酸、チャ抽出物で比較的高い活性が認められた。しかし、

全体的にはほとんどのものが 30%未満の低い値を示した。WST 法の有効性を確認するために、WST 法で測定した結果を、食品などの持つ色などの阻害を受けず、感度・特異性に優れているとされる ESR 法で測定した SOSA の結果と比較した。各種試料の活性相対強度をみると、両者の測定値間に比較的高い一致がみられた。したがって、本法が食品添加物の迅速な SOSA 測定法として利用可能であることが示唆された。

なお、同一品目であっても製品間では各活性値にばらつきが見られたことから、成分組成や有効成分含量が異なることが示唆された。

今回、 $\beta$ -カロテン退色法、DPPH 法、WST 法によって簡便に各活性を測定することができたが、測定方法によって活性値が異なることがわかった。そのため、測定方法によって活性強度の傾向が異なる品目があることがわかった。 $\beta$ -カロテン退色法、DPPH 法、WST 法の 3 つの抗酸化活性測定法で検出している酸化阻害メカニズムは異なる。 $\beta$ -カロテン退色法で得られる抗酸化活性は、脂溶性環境における酸化開始反応とそれに続く連鎖反応の阻害を示していると考えられる。DPPH 法で得られる抗酸化活性は、酸化開始時のラジカル反応の阻害を示していると考えられる。WST 法で得られる抗酸化活性は、スーパーオキシドアニオンラジカルの消去活性を示している。ある化合物がすべての抗酸化作用メカニズムに効果があるとは限らない。酸化防止剤がその作用メカニズムの違いを考慮して用途（添加する食品）を使い分けているように、各酸化防止剤の主成分である抗酸化物質の作用メカ

ニズムによって抗酸化活性測定法を使い分ける必要がある。対象とする添加物品目に適した活性測定法を選択するための検討をさらに続けていく予定である。

#### D. 結論

各種酸化防止剤の抗酸化活性を $\beta$ -カロテン退色法、DPPH法、WST法によって簡便に測定することができたが、測定方法によって活性値が異なることがわかった。

#### E. 参考文献

- 1) 美甘ら：フラボノイド類の抗酸化活性と構造との相関性に関する研究 (1)、日本食品化学学会誌、7、93-96 (2000)
- 2) 受田ら：スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性新規測定法の開発と食品への応用、FFI Journal、208、4-12(2003)
- 3) Yun, Y.S., et al : Determination of antioxidant activity of herbs by ESR. J. Food Hyg. Soc. Japan, 44, 59-62 (2003)

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

表 各種食品添加物の抗酸化活性 (%)

品目	製品数	$\beta$ -カロテン退色法	DPPH 法	WST 法	ESR 法
BHT	1	100	30	0	0
BHA	1	100	62	5	0
没食子酸	1	55	95	82	77
没食子酸フロピル	1	74	93	52	58
エラグ酸	1	79	89	59	28
フェルラ酸	1	65	46	0	0
クエルセチン	3	98 (93~102)	79 (76~80)	25 (11~33)	28
ルチン酵素分解物	1	80	46	17	12
ルチン	2	42 (37, 146)	37 (35, 38)	12 (9, 14)	8
酵素処理イソクエルシトリン	1	68	30	17	7
酵素処理ルチン	2	70 (60, 80)	22 (10, 34)	7 (3, 10)	8
ヘスベリジン	3	38 (9~59)	11 (4~20)	13 (11~14)	2
酵素処理ヘスベリジン	4	33 (29~57)	9 (4~13)	5 (0~14)	0
ナリンジン	2	21 (20, 22)	9 (9, 9)	11 (10, 12)	3
酵素処理ナリンジン	1	15	3	6	0
ユーカリ葉抽出物	1	11	13	11	5
チャ抽出物	10	89 (80~98)	62 (41~84)	58 (33~73)	33
ブドウ種子抽出物	4	86 (74~100)	36 (26~55)	24 (15~40)	25
タンニン	1	87	78	33	35
テンリョウチャ抽出物	1	90	7	38	20
トコフェロール	1	92	22	1	0
酵素処理カンゾウ	1	22	16	2	0

製品数が複数の場合には、同一品目の製品の測定値の平均値を示す。かっこ内の数値は測定値の範囲を示す。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質規格に関する研究

平成17年度分担研究報告書

単一化合物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究

協力研究者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

協力研究者 松本 清 九州大学農学研究院 教授

研究要旨

食品添加物である酸化防止剤の品質規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証を行った。「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中から単一の成分からなる添加物（カテキン、ケルセチン、セサモール、フェルラ酸、ヘスペレチン、没食子酸、モリン、*d*- $\alpha$ -トコフェロール、*d*- $\delta$ -トコフェロール、エラグ酸）を選び出し、そのDPPHラジカル消去活性測定、ABTSラジカル消去活性測定、スーパーオキシドアニオン消去活性（SOSA）測定を行い、各評価系の特徴について調べたところ、3つの評価系における各化合物の活性の高低の傾向は、概して一致していることが明らかとなった。従って、これらの測定法はいずれも酸化防止剤評価方法として適しているものと考えられた。

A. 研究目的

食品への用途が認められている酸化防止剤の品質規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証を行った。今回の研究では、「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中から単一の成分からなる添加物（カテキン、ケルセチン、セサモール、フェルラ酸、ヘスペレチン、没食子酸、モリン、*d*- $\alpha$ -トコフェロール、*d*- $\delta$ -トコフェロール、エラグ酸）を選び出し、そのDPPHラジカル消去活性測定、ABTSラジカル消去活性測定、スーパーオキシドアニオン消去活性（SOSA）測定を行い、各評価系の特徴について調べた。

B. 研究方法

(1) DPPHラジカル消去活性測定

Choiらの方法を一部変更して行った<sup>1)</sup>。

試験管に試料溶液 200  $\mu$ l, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 800  $\mu$ l, 0.20 mM DPPH エタノール溶液 1 ml を添加し、10秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて30分間静置した。30分後、反応溶液の517 nm における吸光度を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロールとした。また、DPPH溶液の代わりにエタノール、あるいは超純水を添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた。

試料のDPPHラジカル消去活性は6-hydroxy-5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid 等価活性、すなわち、Trolox等価活性 (TEAC) で示した。TEAC



とはIC<sub>50</sub>を示すTrolox濃度 (mg/ml) とIC<sub>50</sub>を示す試料濃度 (mg/ml) が等しい活性を有するとみなし、試料 1mgあたりの活性をTrolox等量に換算したものである。

## (2) ABTSラジカル消去活性

Fellengriniらの方法で行った<sup>2)</sup>。7 mM ABTS水溶液 5 mlに140 mM 過硫酸カリウム 88 μl を加え、暗所で室温にて12~16時間インキュベートした。この溶液をABTS stock solutionとし、734 nm の吸光度が0.7 ± 0.02になるようにエタノールで希釈した。これをABTS working solution とした。試験管にABTS working solution 1 ml を分注し、そこに試料 10 μl を添加して、10秒間激しく攪拌し、30℃で4分間インキュベートした。その後、734 nm における吸光度を測定した。試料溶液の代わりに超純水、またはエタノールを添加した場合の吸光度をコントロールとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた。その後、各試料についてTEACを求め、その値をABTSラジカル消去活性とした。

## (3) SOSA

SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所製) の使用方法を一部改変して行った。96穴マイクロプレートに20 μlの試料溶液、200μlのWST-W溶液、20 μlのWST-E溶液を順次添加し、マイクロプレートシェーカーで攪拌した。WST-E溶液の添加から10分後にマイクロプレートリーダーで450 nm における吸光度を測定した。試料の代わりに超純水を添加した際の吸光度をブランク1、WST-Eの代わりにdilution bufferを添加した場合の吸光度をブランク2 (試料添加時)、ブランク3 (超純水添加時) とした。ブラ

ンク1の吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた。

試料のSOSAは、スーパーオキシドジスムターゼ等価活性、すなわちSOD等価活性で示した。SOD等価活性とはIC<sub>50</sub>をもたらすSOD濃度 (units/ml) とIC<sub>50</sub>をもたらす試料濃度 (mg/ml) が等しい活性を有するとみなし、試料1 mgあたりのSOSAをSOD 単位で示したものである。

## C. 研究結果

今回の測定で認められた単一化合物酸化防止剤のDPPHラジカル消去活性、ABTSラジカル消去活性、SOSAを表1に示した。また、各化合物の活性の高低を特徴づけし、表2に示した。表2の上部に位置するほど活性が高く、下部に位置するほど活性が低いことを示している。

### (1) DPPHラジカル消去活性測定

最も高いDPPHラジカル消去活性を示したのは没食子酸であった。また、中間 (没食子酸の半分程度の活性) に位置するのはエラグ酸、ケルセチン、セサモール、カテキン、低い活性しか示さないグループ (没食子酸の活性の5~100分の1程度の活性) に属するのは、フェルラ酸、モリン、*d*-α-トコフェロール、*d*-δ-トコフェロール、ヘスペレチンであることが明らかとなった。

### (2) ABTSラジカル消去活性

高いABTSラジカル消去活性を有する化合物は没食子酸、ならびにセサモール、その約半分程度の活性を示す中間グループに属するのはエラグ酸、ケルセチン、フェルラ酸、カテキンであることが判明した。また、セサモール、ならびに没食子酸の活性

の7~9分の1程度の低い活性を示すグループにはモリン, *d*- $\alpha$ -トコフェロール, *d*- $\delta$ -トコフェロールが属することが明らかとなった。ヘスペレチンのABTSラジカル消去活性は低く, 今回の測定ではIC<sub>50</sub>を求めることができなかった。

### (3) SOSA

没食子酸に極めて高いSOSAが認められることが明らかとなった。また, 没食子酸の5~7分の1のSOSAを示す中間グループにはエラグ酸とカテキンが属し, 数十~数千分の1の低いSOSAしか示さないグループにはケルセチン, フェルラ酸, ヘスペレチン, モリン, セサモールが属することが判明した。*d*- $\alpha$ -トコフェロール, *d*- $\delta$ -トコフェロールは試料溶液をアッセイ系に添加した際に白濁が生じたため測定を行うことができず, SOSAを求めることができなかった。

### D. 考察

DPPHラジカル消去活性測定, ABTSラジカル消去活性測定, ならびにSOSA測定における各単一化合物酸化防止剤の活性の高低の傾向は, 概して一致していることが明らかとなった。唯一の例外はセサモールであり, 3つの評価系において活性の高低が大きく異なっていた。これはセサモールの反応性がラジカル, および活性酸素の種類に大きく依存していることを示していると考えられた。しかしながら, その他の化合物は3つの評価系において, おおよそ同じ傾向を示しており, 本研究で用いた3つの評価系はいずれも酸化防止剤評価方法として適していると考えられた。

### E. 結論

各単一化合物酸化防止剤の活性の高低の傾向は, 3つの評価系(DPPHラジカル消去活性, ABTSラジカル消去活性, SOSA)で概して一致していたことから, これらの評価系はいずれも酸化防止剤評価方法として適していると判断した。今後は, 単一化合物酸化防止剤の脂質自動酸化抑制能とラジカル, および活性酸素活性との関連について調べる予定である。また, 各評価系において得られた測定値のクロスチェックを高知大学と九州大学間で行い, 各化合物の抗酸化活性の基準値を設定する予定である。

### 参考文献

- 1) H-S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4156-4161 (2000)
- 2) N. Fellengrini et al., *Meth. Enzy.*, **299**, 379-389 (1999)

表1 単一化合物酸化防止剤の示す抗酸化活性

酸化防止剤	DPPHラジカル消去活性	ABTSラジカル消去活性	SOSA
	Trolox等価活性		SOD等価活性
カテキン	1.95	0.84	17.7
ケルセチン	2.66	1.62	8.2
セサモール	2.03	3.35	0.1
フェルラ酸	0.89	1.50	1.7
ヘスペレチン	0.06	no inhibition	1.1
没食子酸	3.53	3.99	364.0
モリン	0.82	0.69	0.9
<i>d</i> - $\alpha$ -トコフェロール	0.47	0.53	測定不能
<i>d</i> - $\delta$ -トコフェロール	0.58	0.66	測定不能
エラグ酸	2.86	2.09	37.2

表2 単一化合物酸化防止剤の示す抗酸化活性の特徴

抗酸化活性	DPPHラジカル消去活性	ABTSラジカル消去活性	SOSA
高	没食子酸	没食子酸	没食子酸
		セサモール	
中	エラグ酸	エラグ酸	エラグ酸
	ケルセチン	ケルセチン	カテキン
	セサモール	フェルラ酸	
	カテキン	カテキン	
低	フェルラ酸	モリン	ケルセチン
	モリン	d- $\delta$ -トコフェロール	フェルラ酸
	d- $\delta$ -トコフェロール	d- $\alpha$ -トコフェロール	ヘスペレチン
	d- $\alpha$ -トコフェロール		モリン
	ヘスペレチン		セサモール
no inhibition		ヘスペレチン	

#### 4. 酸化防止剤等の成分・品質に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

分担研究報告書

—ブドウ種子抽出物の分析法に関する研究—

分担研究者 永津 明人 金城学院大学薬学部教授

研究要旨 食品添加物「ブドウ種子抽出物」は酸化防止剤として用いられているが、その規格作成において検討が必要と考えられる点のうち、本年度はカテキン類の HPLC 定量の条件について検討を行った。いくつかの担体の HPLC カラムを検討した結果、Cosmosil Cholesterol を用いたカラムでの分析条件で、各化合物のピークの分離およびベースラインの膨らみとして観測されるバックグラウンドの化合物とカテキン類との分離において比較的良好な結果が得られた。

A. 研究目的

「ブドウ種子抽出物」はブドウ科ブドウの種子を熱水、温エタノール又は温アセトンを用いて抽出したもので、プロアントシアニジン（カテキン類ダイマー—ポリマー）を主成分とし、酸化防止剤として用いられる。

一口にプロアントシアニジンといっても多様な分子があるので個々を定量することは現実的ではなく、業界自主規格でも総フラバノール量から定量可能なカテキン類量を差し引いて総プロアントシアニジン量としている。

しかしながら業界自主規格では、多様な分子の混合物である総フラバノールの定量に発色法を用いるということで測定値と本来の含有量との間の誤差が発生しやすい、カテキン類の

HPLC 定量条件ではベースラインの膨らみとして観測されるバックグラウンドの化合物とカテキン類が重なる (Fig. 1) という問題点がある。そもそも、総プロアントシアニジン量=総フラバノール量—総カテキン類量という方法論が品質規格試験としてふさわしいか検討する必要があると思われるが、今年度は定量可能な部分の改良ということで、カテキン類の同定・定量のための HPLC 条件の改善を目的とした。

B. 研究方法

業界自主規格 HPLC 条件のベースラインの膨らみは、多様なプロアントシアニジンであると推定された。そこで、HPLC において種々のカラム・溶媒条

件を検討して、カテキンとそのポリマー分子と予想できるバックグラウンドの化合物とが分離でき、かつカテキンのピークの同定が容易な条件設定が可能か、日本食品添加物協会から提供を受けた試料のうちの1製品1ロットを用いて検討に取り掛かった。

### C. 研究結果

業界自主規格のカラム条件が ODS とだけ規定されていることから、ODS の密度が高く ODS の特徴が最も顕著にでると考えられるカラムとしてとして、YMC J'spherer ODS H80, 設定されている条件が水の多い移動相であることから、水の多い移動相に強いカラムとして野村化学 RPAQUEOUS C30, 分離能が高い担体であれば、ベースのブロードな部分も個々のピークとして現れる可能性があると考えて 3  $\mu$ m 粒子の ODS カラムである Imtakt Cadenza CD-C18, そして ODS と同程度の疎水性ながら直鎖の ODS とは異なる挙動が期待できる Cosmosil Chorester の4種類のカラムを用い、10 mM リン酸水溶液—10 mM リン酸 MeOH 溶液の系でほぼ同じ濃度勾配条件でクロマトグラムの比較を行った。検出はマルチチャンネルの UV 検出器で 200—350 nm の範囲の吸光度を検出した。

その結果を Fig. 2 に示した。J'spherer ODS H80, RPAQUEOUS C30 ではベー

スラインの膨らみが無くなったように見えたが、2次元クロマトグラムにおいて 20~60 分にかけて 250—280 nm のベースが上がっており、ベースラインの膨らみがいっそう広がっただけであることがわかった。また、RPAQUEOUS C30 ではカテキン類のピークもブロードであった。Cadenza CD-C18 を用いた場合、各ピークはシャープでいい分離を見せたものの、ベースラインの膨らみがカテキン類のピークに重なり、業界自主規格のクロマトグラムに最も近い形になった。Chorester を用いた場合、保持時間の長いカテキン類のピークがベースラインの上昇にかかってくるものの大部分はベースラインの安定した時間帯に検出でき、ODS でベースラインの膨らみとして観測された部分は、カテキン類とは離れて後から大きなブロードなピークとして溶出されてきた。よって、このカラムがカテキン類定量には好条件を与えうることがわかった。

そこで、Cosmosil Chorester を用いて濃度勾配の条件の検討を加えた上、入手可能なカテキン類標準品を用いてピークの同定を行った。(Fig. 3) また、カテキン2量体がどの程度の保持時間になるか確認する目的で、epicatechin の2量体である procyanidin B2 も加えた。標準品として用いた catechin が 21.5 分、epigallocatechin が 22.8 分、epicatechin が 31.0 分、epigallocatechin

gallate が 34.8 分, epicatechin gallate が 42.8 分というそれぞれの保持時間であった。また 2 量体の procyanidin B2 は 26.3 分付近であった。(Fig. 3C) この条件で、ブドウ種子抽出物は Fig. 3A のようなクロマトグラムを与えた。混合物の多いブドウ種子抽出物では保持時間が若干ずれる可能性もあるため、念のためブドウ種子抽出物とカテキン類標準品を予め混合した溶液の分析も行った。ブドウ種子抽出物では 30.3 分付近にピークがあるが、混合物のクロマトグラムではそのすぐ後にピークが現れることから、30.3 分付近のピークは epicatechin のものではなく、ブドウ種子抽出物ではこのピークのベースライン近くにショルダーのようにあるのが epicatechin であることがわかった。また、2 量体の procyanidin B2 も十分に大きなピークとして検出された。

#### D. 考察

今回の分析例では、ブドウ種子抽出物のクロマトグラムにおいて、カテキンとその直前の小ピークとが完全に分離していない、epicatechin とその直前にあるピークとが完全に分離できていない、epicatechin gallate のピーク付近ではプロシアニジン類によると思われるベースラインの上昇が始まっている部分にあり、ピークも小さいので定量が難しい等の問題点がまだ

あるが、業界自主規格に比べてもベースラインの膨らみを各ピークの保持時間から大きくずらすことができ、カテキン類の定量に耐えうるものに改善できたと考えられる。今回用いたカラムのカラム長が 150 mm であったので、250 mm にすることでピークの間隔が不十分だった部分も改善できると考える。

Fig. 3A のクロマトグラムで比較的大きなピークとして観測される 18.5 分、30.3 分、33 分、36 分付近のピークのそれぞれも同定することで、品質指標とすることができるのではないかと思われる。また、procyanidin B2 が十分に大きなピークとして検出されたことから、その他のカテキン 2 量体も多く含まれることが示唆された。今回、1 製品 1 ロットにおける検討だけであるが、今後、分析する製品、ロットの数を増やして検討を行い、含有成分のバラツキの確認と、この条件の定量条件としての汎用性の確認を行う予定である。

#### E. 結論

\*「ブドウ種子抽出物」の業界自主規格において検討が必要と考えられた、カテキン類の HPLC 定量の条件について検討を行った。いくつかの担体を検討した結果、カラムとして Cosmosil Cholesterol, 展開溶媒に 10 mM リン酸 MeOH 溶液—10 mM リン酸水溶液を



用いた分析条件で、ベースラインの膨らみとして観測されていたバックグラウンドの化合物とカテキン類のピークとが分離でき、またピークどおしの分離でも比較的良好な結果が得られた。

\*今回は1製品の1ロットによる検討であったが、製品・ロットを増やして検討することでこの条件の汎用性の確認する必要がある。

\*今回標準品として用いた化合物以外で大きなピークとして検出された化合物の同定する必要がある。これらの化合物も指標成分として活用が可能である。

#### F. 研究発表

現在のところなし

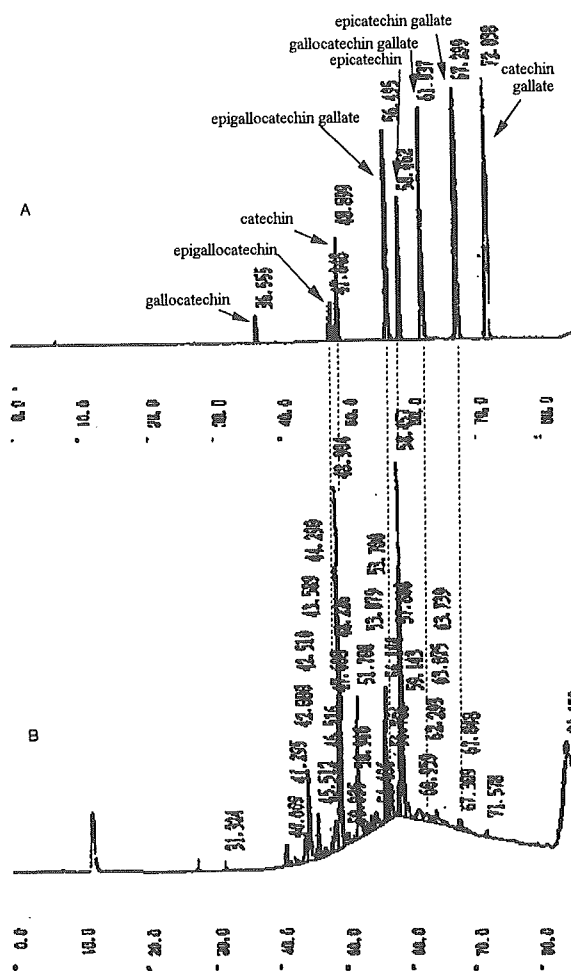


Fig. 1 業界自主規格にしたがって分析した HPLC クロマトグラム  
 カラム: Inertsil ODS-3, 4.6 mm i.d. x 250 mm  
 溶媒: 10mM リン酸水溶液-MeOH = 100:0→20:80  
 の濃度勾配  
 検出: UV 280 nm  
 A: 各種カテキン類の混合物のクロマトグラム。  
 B: ブドウ種子抽出物のクロマトグラム。Fig. 2,3 とは別のロット。

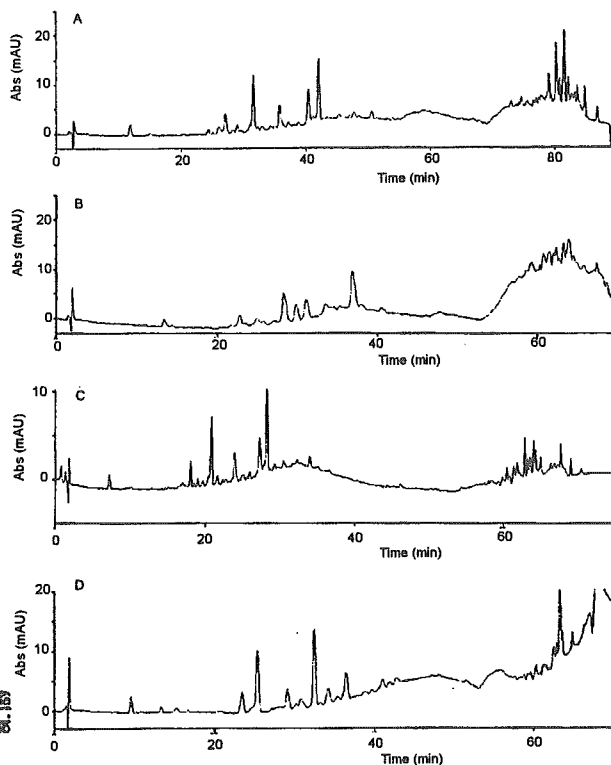


Fig. 2 各種カラムを用い、UV280 nm で検出したブドウ種子抽出物のクロマトグラム  
 A: カラム YMC J'sphere ODS H80, 4.6 mm i.d. x 250 mm; 溶媒: 10 mM リン酸 MeOH 溶液—10 mM リン酸水溶液 = 3:97→35:65 (50 min)→50:50 (65 min)→100:0 (80 min); B: 野村化学 RPAQUEOUS C30; C: Imtakt Cadenza CD-C18.; D: Cosmosil Cholesterol. B, C, D はいずれも 4.6 mm i.d. x 150 mm; 溶媒: 10 mM リン酸 MeOH 溶液—10 mM リン酸水溶液 = 3:97→50:50 (50 min)→100:0 (60 min). いずれの場合もブドウ種子抽出物 1.0 mg/ml を 10  $\mu$ l インジェクト。

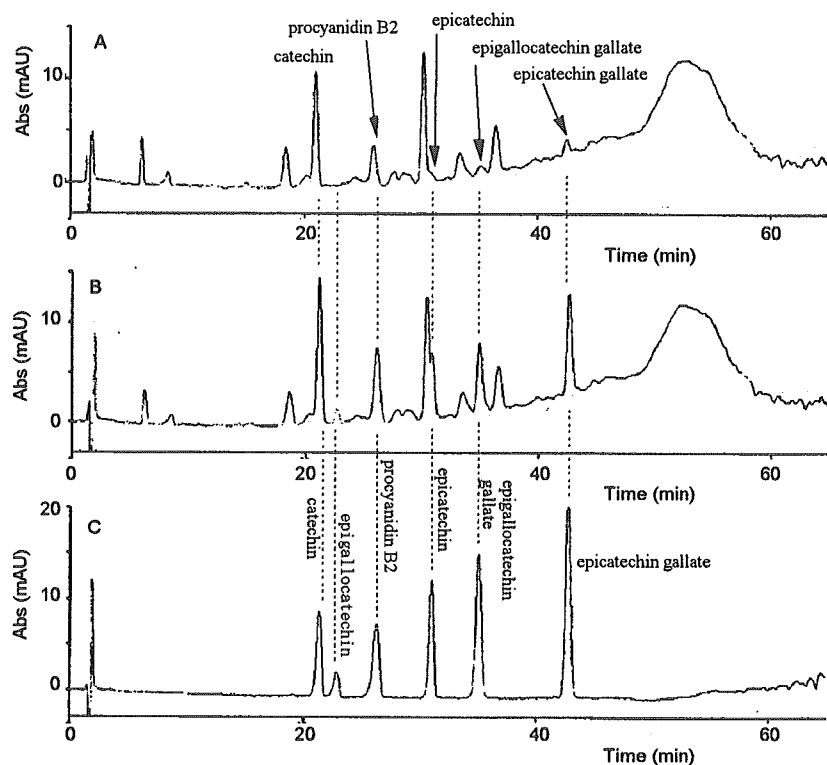


Fig. 3 ブドウ種子抽出物(A), カテキン類標準品(C) と両者の混合物(B)のクロマトグラム  
 Cosmosil Choresre. 4.6 mm i.d. x 150 mm; 溶媒: 10 mM リン酸 MeOH 溶液—10 mM リン酸水溶液 =10:90→  
 40:60 (45 min)→100:0 (80 min). UV 280 nm (黒線), 254 nm (灰色の線).  
 A. ブドウ種子抽出物 1.0 mg/ml を 10  $\mu$ l, B: ブドウ種子抽出物 0.75 mg/ml とカテキン類標準品 約 0.0125  
 mg/ml をそれぞれ含有の混合液を 15  $\mu$ l, C: カテキン類標準品 約 0.05 mg/ml を 10  $\mu$ l, それぞれインジェク  
 ト。カテキン標準品は, catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate,  
 procyanidin B2 (= epicatechin-(4 $\square$ →8)-epicatechin)の6種類

## ソバ葉の成分分析

分担研究者 尹 永淑 東京薬科大学生命科学部 助手

研究要旨 ソバ葉の含有成分を明らかにするため、メタノールにて抽出し、種々のカラムクロマトグラフィーを行った結果、ルチンおよび *quercetin-3-O-L-rhamnopyranoside* が含有されていることが明らかになった。

### A. 研究目的

既存添加物「ルチン（抽出物）」は酸化防止剤として使用されるが、既存添加物名簿収載品目リストには、「ルチン（抽出物）」には、「エンジュ抽出物」、「アズキ全草抽出物」、「ソバ全草抽出物」の3種類があると記載されている。しかし、これまで「エンジュ抽出物」だけが市場に流通しており、「エンジュ抽出物」の品質規格が第8版食品添加物公定書に収載予定である。一方、ソバ葉にはソバの実以上にルチンが多く含まれていることから、ソバ葉を使った食品開発が最近進んでいる。そこで、「ルチン（抽出物）」として「ソバ全草抽出物」が今後市場で販売される可能性を予想し、ソバ由来ルチン抽出物製品の成分分析法を開発することを目的として、ソバ葉に含まれる成分の解析を行った。ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench) の葉の含有成分としてルチンがよく知られているが、それ以外のフラボノイドを含めた含有成分の詳細については知られていない。そこで、含有成分の化学構造を明らかにすることをめざした。

### B. 研究方法

#### ソバ葉の成分分析

ソバ葉の試料として、ソバ葉乾燥粉末製品（日本そばを製造する際に加える補助食材として市販されている食品素材製品）を使用した。ソバ葉乾燥粉末 317 g をメタノールにて抽出し、得られたメタノール抽出物 (70.6 g) について HP-20 カラムクロマトグラフィー (10.5 × 45 cm) を行い（メタノール：水溶媒系）、6つの画分 (Frs. 1-6) を得た。その中の Frs. 5 (6.46 g) に沈殿物 (3.01 g) が生じ、上澄みについて RP-18 HPLC (10%→80% CH<sub>3</sub>CN/min.) 分析 および分離・精製を行った。

#### ルチンの定量

購入した試薬ルチン（和光純薬工業株式会社）を用い、検量線 (2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL) を作成した。ソバ葉乾燥粉末 1g を 50 mL MeOH に懸濁させ上澄み 5 μL を取り定量を行った。

#### HPLC の条件

分析および定量：カラム：RP-18（関東化学株式会社、4.6 × 250 mm）、移動相 (10%→80% CH<sub>3</sub>CN/min. または 10%→30% CH<sub>3</sub>CN/min.)、検出器：紫外可視検出器（島津、254 nm）