

200939057A

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「酸化防止剤」の製法による抗酸化能
及び主要成分の変動解析

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松山大学 薬学部 天倉 吉章

分担研究者 松山大学 薬学部 好村 守生

松山大学 薬学部 吉田 隆志

目 次

I. 総括研究報告

既存添加物「酸化防止剤」の製法による抗酸化能及び主要成分の変動解析 …………… 1

天倉吉章

II. 分担研究報告書

1. 天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明及び天然酸化防止剤の製法による
抗酸化能の変動解析

天倉吉章, 好村守生

1-1. ドクダミ抽出物に関する検討 …………… 6

1-2. ウイキョウ抽出物に関する検討 …………… 17

1-3. セージ抽出物に関する検討 …………… 27

1-4. ピメンタ抽出物に関する検討 …………… 37

1-5. クローブ抽出物に関する検討 …………… 53

2. 天然酸化防止剤の製法による主要成分の提案 …………… 69

吉田隆志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 74

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 75

I. 総括研究報告書

既存添加物「酸化防止剤」の製法による抗酸化能及び主要成分の変動解析

研究代表者 天倉吉章 松山大学薬学部 准教授

研究要旨

本研究では、既存添加物の中で抽出物が多い酸化防止剤に重点を置き、既存添加物名簿に記載されている製法の範囲内で複数の抽出物（モデル酸化防止剤）を調製し、抗酸化能およびそれらの成分分布を評価、解析することで、添加物の適正使用のための規格化に寄与する科学データの集積を目的として研究を実施した。平成21年度（2年計画の1年目）は5品目（ドクダミ、セージ、ウイキョウ、ピメンタ、クローブ）について検討し、酸化防止剤として有効な添加物製法に関する新たな知見を得た。

ドクダミ抽出物については、50%エタノール抽出物が強い抗酸化活性を示した。さらに分画物を調製して精査した結果、quercitrinが主成分、有効成分として同定され、quercitrin含量を目安に調製する方法が有効であることが示された。

セージ抽出物については、50%エタノール抽出物が高抗酸化活性を示した。抽出物の抗酸化活性画分の含有成分を分析したところ、rosmarinic acidが主成分および有効成分として同定され、rosmarinic acid含量を目安に調製する方法が有効であることが明らかとなった。

ウイキョウ抽出物については、全体的に抗酸化能は顕著ではなかった。精油を含む画分は抗酸化活性をほとんど示さず、極性画分に有効成分の含有が示唆されたため、成分分析をしたところ、syringinとともにマイナー成分が検出された。これらマイナー成分については現在検討中であるが、syringinが1主成分として同定された。

ピメンタおよびクローブ抽出物については、いずれも低極性画分の活性が顕著に強かった。含有成分を分析したところ、主ピークとしてeugenolが検出され、有効成分であることが認められた。それゆえeugenolを保持でき、その含量を目安に調製する方法が有効であることが示された。また極性画分にも抗酸化活性が認められ、抗酸化成分であるポリフェノール類の存在が明らかとなったことから、水蒸気蒸留物を除いた残渣抽出物の添加物としての利用も示唆された。

研究分担者

好村守生 松山大学薬学部 助教

吉田隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

既存添加物は、天然添加物として使用実績があるものの使用を経過措置として認めている

添加物である。それゆえ成分規格が未整備なものが多かったが、厚生労働科学研究を軸とした成分および安全性データに基づいた厚生労働省、食品安全委員会の積極的な措置により、使用実態のないものの削除を含めた整備が徐々に進みつつある。一方で、既存添加物の多くは天然物由来の抽出物であり、多種多様の成分

を含有する。それゆえ含有成分を網羅し、有効成分を特定するには膨大な時間と労力が必要となり、整備が急速に進まない現実もある。また、特に天然物を原料とすることから、データの信頼性確保のためには様々な科学的検証の集積が不可欠であり、残された課題も多い。その中で、製法の整備についても今後の課題の一つとしてあげられる。製法については、既存添加物名簿に手法が記され、それに準じた方法により調製することが出来る。しかしその範囲は広く、製法により抽出される成分や有効性が異なる事も想定される。添加物の用途に応じた適切な製法を提案することは、添加物の適正使用を促し、また化学分析により実態を明確にすることで、安全性の評価にも寄与する。このことは食品業界のみならず、日本国民の食品添加物使用における安全、安心に繋がる事が示唆される。

そこで本研究では、既存添加物の中で抽出物が多い酸化防止剤に重点を置き、既存添加物名簿に記載されている製法の範囲内で複数の抽出物（モデル酸化防止剤）を調製し、抗酸化能およびそれらの成分分布を評価、解析することを目指した。平成 21~22 年度の 2 年間で 10 品目の植物原料について検討を予定しており、21 年度は 5 品目（ドクダミ、セージ、ウイキョウ、ピメンタ、クローブ）について、以下の 3 点を目標に研究を実施し、添加物の適正使用のための規格化に寄与する科学データの集積を目指した。

- ①既存添加物名簿記載の製法に準拠した数製法によるモデル酸化防止剤を調製し、未同定成分の構造解明を含めた含有成分の網羅的解析を行う。
- ②作製した各モデル酸化防止剤の抗酸化活性を評価する。
- ③各モデル酸化防止剤の主要成分を明確にし、酸化防止剤として目的に応じた有効で優れた製法を提案する。

B. 研究方法

1. 天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と未同定成分の構造解明

既存添加物名簿に記載されている酸化防止剤の抽出物のうち、成分に関する情報の乏しいものおよび製法が広範囲なものを選択した。今年度の研究対象としては、クローブ、セージ、ドクダミ、ピメンタ、ウイキョウの 5 植物を試料原料とした。原料を複数の製法により調製した抽出物（モデル酸化防止剤）について含有成分の変動解析を行った。成分についてはカラムクロマトグラフィーなどによる分離、精製を繰り返し、単離した化合物について各種機器分析データに基づいて構造解析、同定を行った。さらに未同定成分については構造決定を実施した。

2. 天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析

各製法によるモデル酸化防止剤について抗酸化活性を評価した。抗酸化活性は、米国で広く適用されている ORAC (oxygen radical absorbance capacity) により評価し、製法による抗酸化能の変動解析を行った。

3. 天然酸化防止剤の製法による主要成分の提案

製法と抗酸化能、主要成分の関係が明らかになったことで、それら科学データに基づいた食品添加物「酸化防止剤」として有効な製法を提案、考察した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、ヒト組織および実験動物を使用せず、ヒトを研究対象としないので、倫理面での問題はない。

C. 結果・考察

1. 天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明および天然酸化防止剤の製法によ

る抗酸化能の変動解析

1-1. ドクダミ抽出物に関する検討

50%エタノールおよびエタノール抽出物の含有成分および抗酸化活性について比較検討を行った。まず含有成分を明らかにするために HPLC 分析を行ったところ、いずれも主成分と思われる主ピーク 1 本と複数のマイナーピークが検出された。それら成分について精査したところ、主検出成分として quercitrin (quercetin 3-*O*- α -L-rhamnoside) とともに 9 種のマイナー成分を単離、同定した。次に各抽出物について、抗酸化活性 (ORAC 測定) を測定したところ、50%エタノール抽出物の抗酸化活性が強かった。抗酸化活性成分を明らかにするために、抽出物の分画物 (ヘキサン, 酢酸エチル, 水各分画物) を調製し、抗酸化活性を測定した。その結果、酢酸エチル分画物が最も強い抗酸化活性を示した。酢酸エチル分画物について HPLC 分析を行ったところ、主成分の quercitrin およびその他のフラボノール配糖体が検出され、これらが有効 (指標) 成分であることが示唆された。

1-2. ウイキョウ抽出物に関する検討

原料となるウイキョウから各製法 (50%エタノール, エタノール, 水蒸気蒸留, 水蒸気蒸留物除去熱水抽出) による抽出物を調製し HPLC 分析したところ、それぞれの抽出物において 1~2 本の主ピークが複数のマイナーピークとともに検出された。含有成分について精査したところ、syringin など計 6 種の化合物を単離、同定した。各製法による成分比較をすると、50%エタノールの主検出成分は syringin と quercetin 3-*O*- β -D-glucuronide であった。エタノール抽出物は未同定化合物を検出し、水蒸気蒸留物は anethole に由来する主 1 ピークが認められた。また水蒸気蒸留物除去抽出物からは、sinapyl alcohol

1,3'-di-*O*- β -D-glucoside と syringin の 2 主ピークが観察された。各抽出物について抗酸化活性を測定したところ、全体的に抗酸化活性は弱かった。その中で、抗酸化活性が強かったのは 50%エタノールおよび水蒸気蒸留物除去抽出物であった。これらの抗酸化成分を明らかにするために、分画物 (*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水各分画物) を調製し、抗酸化活性を測定した。その結果、酢酸エチル分画物が最も強い抗酸化活性を示した。そこで酢酸エチル分画物の含有成分について HPLC 分析を行った結果、主成分の 1 つである syringin が検出され、他にマイナー成分も検出された。現在、それら成分について検討中である。

1-3. セージ抽出物に関する検討

50%エタノール, エタノール, *n*-ヘキサン, 水各抽出物の HPLC 分析を行ったところ、それぞれの抽出物において 1~3 本の主ピークが複数のマイナー成分とともに検出された。含有成分について精査したところ、rosmarinic acid など計 6 種の化合物を単離、同定することが出来た。各製法による成分比較をすると、50%エタノールおよび水抽出物の主検出成分は rosmarinic acid, luteolin 7-*O*- β -D-glucuronide などであり、エタノール抽出物にもそれらピークが検出されたが含有が少なく、*n*-ヘキサン抽出物にはほとんど検出されなかった。各抽出物の抗酸化活性を測定したところ、50%エタノール抽出物が最も強く、次いで水抽出物が活性を示した。これらの抗酸化成分を明らかにするために、分画物 (*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水各分画物) を調製し、抗酸化活性を測定した。その結果、酢酸エチル分画物が強い抗酸化活性を示し、その HPLC 分析は rosmarinic acid を主ピークとして検出したことから、有効 (指標) 成分の一つであることが示唆された。

1-4. ピメンタ抽出物に関する検討

含水エタノール (50%, 80%) またはエタノールを用いた抽出エキスを作成し、それらの抗酸化能を評価した結果、80%エタノール抽出エキスに最も強い活性を認めたため、抗酸化活性を指標としたその詳細な成分精査を行い、1種の文献未記載の化合物 [(2S)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,2-diol 1-O-(6'-O-galloyl)-β-D-glucoside] を含む15種の化合物を単離し、その構造を明らかにした。これらの化合物を標準試料としたHPLCによる各抽出エキス (50%エタノール抽出物, 80%エタノール抽出物, エタノール抽出物) との直接比較から、80%エタノール抽出物の主構成成分は eugenol および thymol であり、これらが本添加物の抗酸化活性に大きく寄与していることが示唆された。一方で、80%エタノール抽出エキスの酢酸エチル分画物も強い抗酸化活性を示し、ポリフェノール類が認められたことから、これらが有する強い抗酸化活性もピメンタ抽出物の機能に寄与していると考えられた。

1-5. クローブ抽出物に関する検討

アセトン, 50%エタノール, 80%エタノール, エタノール, 水蒸気蒸留で抽出し、それらの抗酸化活性を測定した。その結果、水蒸気蒸留物および80%エタノール抽出物に顕著な活性を認めた。これら抽出物の成分精査を行った結果、主成分は eugenol であり、抗酸化活性がその含量に依存していることが観察された。また、80%エタノール抽出物の成分精査から、文献未記載の1種の化合物 [6'-O-acetylisobiflorin] とともに16種の既知化合物を単離し、それぞれの構造を明らかにした。

2. 天然酸化防止剤の製法による主要成分の提案

今年度実施した抽出物 (ドクダミ, ウイキ

ョウ, セージ, ピメンタ, クローブ) およびユーカリ葉抽出物の製法による成分分布と抗酸化活性の比較検討結果に基づき、酸化防止剤として有効な抽出法および指標となり得る成分について考察した。一連の検討の結果、天然酸化防止剤には低極性または高極性化合物を有効成分とするものがあり、用途に応じて使い分けをすることで、より効果的な添加物利用が可能であることが考察された。

D. 結論

天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明および抗酸化能の変動解析の研究では、ドクダミ, セージ, ウイキョウ, ピメンタ, クローブを対象に研究を実施し、それぞれの酸化防止効果に寄与する成分を明らかにすることができ、それらを指標にした製法を提案することができた。ドクダミ抽出物については、quercitrin 含量を目安に含水エタノールで調製する方法が有効であることが示された。セージ抽出物については、rosmarinic acid 含量を目安に含水エタノールで調製する方法が有効であることが明らかとなった。ウイキョウ抽出物については、全体的に抗酸化能は顕著ではなかったが、極性画分に有効成分の含有が示唆され syringin とともにマイナー成分が検出された。これらマイナー成分については現在検討中であるが、syringin が1主成分として同定された。ピメンタおよびクローブ抽出物については、いずれも低極性画分の活性が顕著に強く、eugenol が有効成分であることが認められた。それゆえ eugenol を保持でき、その含量を目安に調製する方法が有効であることが示された。一方で極性画分にも抗酸化活性が認められ、抗酸化成分であるポリフェノール類の存在が明らかとなったことから、水蒸気蒸留物を除いた残渣抽出物の添加物としての利用も示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida T, Amakura Y, Yoshimura M.
Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order Myrtales, *Int. J. Mol. Sci.* 2010: 11, 79–106.

2. 学会発表

- 1) 好村守生, 天倉吉章, 吉田隆志 : 天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析. 日本生薬学会第 56 回年会 (2009. 10).
- 2) 好村守生, 天倉吉章, 吉田隆志 : フトモモ科植物の成分研究 : オールスパイス (*Pimenta dioica*) の抗酸化成分. 日本薬学会第 130 年会 (2010. 3).
- 3) Yoshida T, Yoshimura M, Amakura Y : Polyphenols in myrtaceous plants: Polyphenolic compounds in clove and pimento and their antioxidative activities. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research and the 7th Tannin Conference (2010. 8) (発表予定).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告書

1. 天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明及び天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析

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）
分担研究報告書

既存添加物「酸化防止剤」の製法による抗酸化能及び主要成分の変動解析
天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明
天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析
ドクダミ抽出物に関する検討

分担研究者 天倉吉章 松山大学薬学部 准教授
好村守生 松山大学薬学部 助教

研究要旨

既存添加物名簿に記載されている酸化防止剤ドクダミ抽出物の製法による成分分布を精査する目的で、50%エタノールおよびエタノール抽出物の含有成分および抗酸化活性について比較検討を行った。まず含有成分を明らかにするために HPLC 分析を行ったところ、いずれも主成分と思われる主ピーク 1 本と複数のマイナーピークが検出された。それら成分について精査したところ、主検出成分として quercitrin (quercetin 3-O- α -L-rhamnoside)、その他のマイナー成分として kaempferol 3-O- α -L-rhamnoside, quercetin, isoquercitrin (quercetin 3-O- β -D-glucoside), rutin, quercetin 3-O- β -D-galactoside, quercetin 3-O- α -L-rhamnoside 7-O- β -D-glucoside, chlorogenic acid, 3-O-caffeoyl quinic acid, 4-O-caffeoyl quinic acid の計 10 種の化合物を単離、同定した。製法による成分比較をすると、いずれも主ピークは quercitrin であり、50%エタノールではカフェー酸誘導体が多く検出された。次に各抽出物について、抗酸化活性 (ORAC 測定) を測定したところ、50%エタノール抽出物の抗酸化活性が強かった。これらの抗酸化活性成分を明らかにするために、抽出物の分画物 (*n*-ヘキサン、酢酸エチル、水各分画物) を調製し、抗酸化活性 (ORAC 測定) を測定した。その結果、酢酸エチル分画物が最も強い抗酸化活性を示した。酢酸エチル分画物について HPLC 分析を行ったところ、主成分の quercitrin およびその他のフラボノール配糖体が検出され、これらが有効 (指標) 成分であることが示唆された。

研究協力者

吉田隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

ドクダミ [*Houttuynia cordata* Thunb. (ドクダミ科)] は、花期の地上部がジュウヤク (重薬, 十薬) として日本薬局方に記載されており¹⁾、主な薬効として利尿, 抗菌があげられる。また日本三大民間薬の一つであり、国内

では馴染みのある薬草の一つである。基原である *H. cordata* の含有成分については、LC/MS や GC/MS により広い範囲で網羅的な成分解析が行われており、精油成分やフェノール成分、アルカロイドの含有が報告されている^{2,3)}。

このドクダミを原料とする食品添加物ドクダミ抽出物は、既存添加物名簿収載品目リストに、用途は酸化防止剤、基原・製法・本

質は「ドクダミ科ドクダミ (*Houttuynia cordata* THUNB.) の葉より、エタノールで抽出し、精製して得られたものである。主成分はイソクエルシトリンである」と記載されている。ドクダミ抽出物については、平成 20 年度の厚生労働科学研究において成分分析が実施され、フラボノイド (rutin, hyperin, isoquercitrin, quercitrin, quercetin) やカフェー酸誘導体の含有が確認されており、主成分は既存添加物名簿に記載されている isoquercitrin より quercitrin の含量が約 10 倍多いことが報告されている⁴⁾。一方で、抗酸化活性を指標にした効率的製法に関する研究報告は見当たらない。

このような背景をもとに、本研究では、食品添加物として有効な製法を提案するための科学データの構築を目的に、ドクダミ抽出物の製法について、名簿に記載されている製法に準拠した複数の抽出物を調製し、抗酸化能およびそれらの成分分布について検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

試料として、ドクダミはウチダ和漢薬製を用いた。分離、精製に使用したカラム充填剤は、Diaion HP-20 (三菱化学)、MCI GEL CHP20P (75–150 μm) (三菱化学)、Toyopearl HW-40 (fine) (東ソー)、YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシイ) で、その他の試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

2. 装置及び測定条件

NMR : Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社) ($^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 126 MHz) により、測定溶媒として dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6) , methanol- d_4 (CD_3OD), deuterium oxide (D_2O) を使用し、ケミカルシフトはすべて TMS 基

準のシフト値を δ 値で表示した。

高分解能 (HR) ESI-MS : microTOF-Q 質量分析装置 (ブルカー・ダルトニクス社) でアセトニトリルまたはメタノールを溶媒として測定した。

UV : Shimadzu UVmini-1240 (島津製作所) を使用した。

逆相 HPLC (分析) : Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラム : L-column ODS (2.1 I.D. \times 150 mm) (化学物質評価研究機構), カラム温度 : 40°C, 流速 : 0.3 mL/min, 測定波長 : 200–400 nm, 移動相 : (A) 5%酢酸水溶液および (B) メタノール [濃度勾配条件 (B in A) : 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)].

逆相 HPLC (分取) : Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラム : YMC-Pack ODS (10 I.D. \times 150 mm) (ワイエムシイ), カラム温度 : 40°C, 流速 : 2.0 mL/min, 測定波長 : 200–400 nm, 移動相 : (A) 5%酢酸水溶液および (B) メタノール [濃度勾配条件 (B in A) : 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)].

順相 HPLC (分析) : TOSOH UV-8010 (検出器), DP-8020 (ポンプ) (東ソー) を使用した。カラム : YMC-Pack SIL A-002 (4.6 I.D. \times 150 mm) (ワイエムシイ), 流速 : 1.5 mL/min, 測定波長 : 280 nm, 移動相 : *n*-ヘキサン-メタノール-THF-ギ酸 (55:33:11:1) (シユウ酸を 450 mg/L 含有)。

3. 試料の調製

ドクダミの葉を選別して粉碎し、その 2 g をエタノールまたは 50%エタノール [エタノール-水 (1:1)] (40 mL) を加え、20 分間超音波処理した。抽出液を吸引ろ過し、得られ

たる液を濃縮後、凍結乾燥し、各試料 (①エタノール抽出物, ②50%エタノール抽出物) とした。

分離, 精製の試料は, ドクダミ (450 g) をブレンダーで粉碎し, 80%エタノール [エタノール-水 (8:2)] (4 L) で抽出後, *n*-ヘキサン (1.5 L), 酢酸エチル (1.5 L) で順次分画した。各分画物を濃縮し, 分画濃縮物 [*n*-ヘキサン分画物 (3.5 g), 酢酸エチル分画物 (5.7 g), 水分画物 (25.6 g)] を得た。HPLC で主ピークが観察された酢酸エチル分画物, 水分画物について各種カラムクロマト (Diaion HP-20, MCI-gel CHP20P, Toyopearl HW-40, YMC GEL ODS-AQ および HPLC 分取) による分離精製を繰り返し, 5-*O*-caffeoyl quinic acid (neochlorogenic acid) (1) (15 mg), 3-*O*-caffeoyl quinic acid (chlorogenic acid) (2) (20 mg), 4-*O*-caffeoyl quinic acid (cryptochlorogenic acid) (3) (5 mg), quercetin 3-*O*- α -L-rhamnoside 7-*O*- β -D-glucoside (4) (12 mg), rutin (5) (4 mg), hyperin (quercetin 3-*O*- β -D-galactoside) (6) (5 mg), isoquercitrin (quercetin 3-*O*- β -D-glucoside) (7) (6 mg), quercitrin (quercetin 3-*O*- α -L-rhamnoside) (8) (55 mg), kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnoside (9) (5 mg), quercetin (10) (2 mg) を単離, 同定した。化合物の同定は, 文献値との比較, あるいは標品との機器分析データを直接比較することにより行った。これらを標品とし, 各抽出物の分析に使用した。

4. 抗酸化活性

抗酸化活性は, ORAC (oxygen radical absorbance capacity) により評価した。各試料 3 回測定し, その平均値を活性値とした。

ORAC: マイクロプレートの各ウェルに試料溶液 20 μ L, 94.4 nM fluorescein/75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 μ L, 320 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 溶液 75 μ L を入れて振とうさせた

後, 37°C でインキュベートしながら 2 分間隔で 90 分間経時的に蛍光度 (Em.: 520 nm, Ex.: 485 nm) を測定し, 試料重量当り ORAC 値を算出し, Trolox 当量 (μ mol TE/g) で表した。

C. 研究結果

1. 含有成分の単離, 同定

ドクダミのエタノール抽出物および 50% エタノール抽出物について HPLC 分析を行ったところ, 図 1 (a, b) に示すクロマトグラムが得られた。これらピークを同定するための標品を得る目的で, ドクダミの 80% エタノール抽出物について, *n*-ヘキサン, 酢酸エチルで順次分配し, これら分画物を得た。図 1 (c-f) に 80% エタノール抽出物および各分画物の HPLC クロマトグラムを示す。これらピークを同定するため, 各種カラムクロマトによる分離, 精製を繰り返し, 計 10 種類の化合物を単離することが出来た。化合物については, MS, NMR などの機器分析データに基づいた構造解析, および標品との直接比較により以下のように同定した (化合物 1-10)。

- 1 : 5-*O*-caffeoyl quinic acid
- 2 : chlorogenic acid (3-*O*-caffeoyl quinic acid)
- 3 : 4-*O*-caffeoyl quinic acid
- 4 : quercetin 3-*O*- α -L-rhamnoside 7-*O*- β -D-glucoside
- 5 : rutin (Quercetin 3-*O*- α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucoside)
- 6 : hyperin (quercetin 3-*O*- β -D-galactoside)
- 7 : isoquercitrin (quercetin 3-*O*- β -D-glucoside)
- 8 : quercitrin (quercetin 3-*O*- α -L-rhamnoside)
- 9 : kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnoside
- 10 : quercetin

各化合物の構造式を図 2 に示す。以下に各化合物の分析データを記す。これらを標品と

し、添加物製品中の含有成分について検討した。

5-O-Caffeoylquinic acid (Neochlorogenic acid)

(1) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.58 (1H, d, $J=16$, H-7'), 7.05 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.93 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6'), 6.75 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.29 (1H, d, $J=16$, H-8'), 5.30 (1H, m, H-5), 4.12 (1H, m, H-3), 3.60 (1H, m, H-4), 1.89-2.20 (4H, m, H-2, 6). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 178.3 (C-7), 169.0 (C-9'), 149.4 (C-4'), 146.8 (C-7'), 146.8 (C-3'), 127.9 (C-1'), 122.9 (C-6'), 116.4 (C-5'), 115.8 (C-8'), 115.1 (C-2'), 75.4 (C-1), 74.8 (C-4), 73.0 (C-3), 68.3 (C-5), 41.5 (C-6), 38.7 (C-2). ESI-MS m/z 353 $[\text{M-H}]^-$.

3-O-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid)

(2) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.55 (1H, d, $J=16$, H-7'), 7.04 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.95 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6'), 6.77 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.25 (1H, d, $J=16$, H-8'), 5.33 (1H, m, H-3), 4.26 (1H, m, H-5), 3.71 (1H, dd, $J=3$, 8.5, H-4), 1.98-2.20 (4H, m, H-2, 6). ESI-MS m/z 353 $[\text{M-H}]^-$.

4-O-Caffeoylquinic acid (Cryptochlorogenic acid)

(3) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.63 (1H, d, $J=16$, H-7'), 7.05 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.96 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6'), 6.77 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.35 (1H, d, $J=16$, H-8'), 4.79 (1H, dd, $J=3$, 9, H-4), 4.27 (2H, m, H-3, 5), 2.20 (1H, ddd, $J=3$, 5, 13, H-6), 2.17 (1H, dd, $J=4$, 14, H-2), 2.06 (1H, ddd, $J=3$, 4, 14, H-2), 2.00 (1H, ddd, $J=11$, 13, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 177.6 (C-7), 169.0 (C-9'), 149.6 (C-4'), 147.1 (C-7'), 146.8 (C-3'), 127.9 (C-1'), 123.0 (C-6'), 116.5 (C-5'), 115.4 (C-8'), 115.2 (C-2'), 79.3 (C-4), 76.7 (C-1), 69.6 (C-3), 65.6 (C-5), 42.6 (C-6), 38.6 (C-2). ESI-MS m/z 353 $[\text{M-H}]^-$.

Quercetin 3-O- α -L-rhamnoside 7-O- β -D-glucoside (4) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.36 (1H, d,

$J=2$, H-2'), 7.33 (1H, dd, $J=2$, 8.5, H-6'), 6.90 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 6.73 (1H, $J=2$, H-8), 6.48 (1H, d, $J=2$, H-6), 5.37 (1H, d, $J=1.5$, Rha H-1), 5.05 (1H, d, $J=7.5$, Glc H-1), 4.21 (1H, m, Rha H-2), 3.92 (1H, dd, $J=2$, 12, Glc H-6), 3.75 (1H, dd, $J=3.5$, 9.5, Rha H-3), 3.72-3.35 (8H, m, Rha H-3-5, Glc H-2-6), 0.94 (3H, d, $J=6.5$, Rha H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 179.9 (C-4), 164.7 (C-7), 162.9 (C-5), 159.9 (C-2), 158.1 (C-9), 150.0 (C-4'), 146.5 (C-3'), 136.5 (C-3), 123.0 (C-6'), 122.8 (C-1'), 117.0 (C-2'), 116.4 (C-5'), 107.7 (C-10), 103.5 (Rha C-1), 101.6 (Glc C-1), 100.8 (C-6), 95.8 (C-8), 78.4 (Glc C-5), 77.9, 74.7, 73.3, 72.1, 72.0, 71.9, 71.3 (Rha C-2-5, Glc C-2-4), 62.5 (Glc C-6), 17.7 (Rha C-6).

Rutin (Quercetin 3-O- α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucoside (5) : $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6+\text{D}_2\text{O}$) δ

7.54 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6'), 7.52 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.84 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 6.39 (1H, $J=2$, H-8), 6.20 (1H, d, $J=2$, H-6), 5.33 (1H, d, $J=7.5$, Glc H-1), 4.38 (1H, brs, Rha H-1), 3.71-3.05 (10H, m, Glc H-2-6, Rha H-2-5), 0.98 (3H, $J=6.5$, Rha H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 177.4 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.5 (C-2, 9), 148.4 (C-4'), 144.7 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.9 (C-6'), 121.2 (C-1'), 116.3 (C-2'), 115.2 (C-5'), 104.0 (C-10), 101.2 (Glc C-1), 100.7 (Rha H-1), 98.7 (C-6), 93.6 (C-8), 76.4 (Glc C-3), 75.9 (Glc C-5), 74.1 (Glc C-2), 71.8 (Rha C-4), 70.6 (Rha C-3), 70.4 (Rha C-2), 70.0 (Glc C-4), 68.2 (Rha C-5), 67.0 (Glc C-6), 17.7 (Rha C-6).

Hyperin (Quercetin 3-O- β -D-galactoside (6) :

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.82 (1H, d, $J=2$, H-2'), 7.58 (1H, dd, $J=2$, 8.5, H-6'), 6.84 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 6.39 (1H, $J=2$, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2$, H-6), 5.14 (1H, d, $J=8$, Gla H-1), 3.84 (1H, d, $J=2.5$, Gla H-4), 3.80 (1H, dd, $J=8$, 9.5, Gla H-2), 3.63 (1H, dd, $J=6$, 11.5, Gla H-6),

3.53-3.56 (2H, m, Gla H-3, 6), 3.46 (1H, t, $J=6.5$, Gla H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 177.4 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.2 (C-2, 9), 148.4 (C-4'), 144.7 (C-3'), 133.5 (C-3), 121.9 (C-6'), 121.0 (C-1'), 115.9 (C-5'), 115.1 (C-2'), 103.9 (C-10), 101.8 (Gla C-1), 98.6 (C-6), 93.4 (C-8), 75.8 (Gla C-5), 73.2 (Gla C-3), 71.2 (Gla C-2), 67.9 (Gla C-4), 60.1 (Gla C-6).

Isoquercitrin (Quercetin 3-O- β -D-glucoside) (7): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.69 (1H, d, $J=2$, H-2'), 7.57 (1H, dd, $J=2$, 8.5, H-6'), 6.85 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 6.37 (1H, $J=2$, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2$, H-6), 5.22 (1H, d, $J=8$, Glc H-1), 3.70 (1H, d, $J=5.5$, Glc H-6), 3.56 (1H, dd, $J=5.5$, 12, Glc H-6), 3.47, 3.41 (each 1H, t, $J=10$, Glc H-3, 4), 3.33 (1H, dd, $J=7.5$, 10, Glc H-2), 3.21 (1H, m, Glc H-5).

Quercitrin (Quercetin 3-O- α -L-rhamnoside) (8): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.32 (1H, d, $J=2$, H-2'), 7.29 (1H, dd, $J=2$, 8.5, H-6'), 6.89 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 6.34 (1H, $J=2$, H-8), 6.17 (1H, d, $J=2$, H-6), 5.34 (1H, d, $J=1.5$, Rha H-1), 4.21 (1H, m, Rha H-2), 3.74 (1H, dd, $J=3.5$, 9.5, Rha H-3), 3.42-3.30 (2H, m, Rha H-4, 5), 0.93 (3H, d, $J=6.5$, Rha H-6).

Kaempferol 3-O- α -L-rhamnoside (9): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.76 (2H, d, $J=8.5$, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, $J=8.5$, H-3', 5'), 6.36 (1H, $J=2$, H-8), 6.20 (1H, d, $J=2$, H-6), 5.37 (1H, d, $J=1.5$, Rha H-1), 4.21 (1H, m, Rha H-2), 3.69 (1H, dd, $J=3.5$, 9.5, Rha H-3), 3.42-3.30 (2H, m, Rha H-4, 5), 0.92 (3H, d, $J=6.5$, Rha H-6).

Quercetin (10): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.65 (1H, d, $J=2$, H-2'), 7.62 (1H, dd, $J=2$, 8.5, H-6'), 6.87 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 6.37 (1H, $J=2$, H-8), 6.17 (1H, d, $J=2$, H-6).

2. 調製抽出物の成分分布

ドクダミのエタノール抽出物および 50% エタノール抽出物の HPLC クロマトグラムを比較したところ、いずれも保持時間 23 分付近に主要ピークが検出された。このピークを解析したところ、quercitrin (8) と同定された [図 1 (a, b)]。また、その他のフラボノール類 [quercetin 3-O- α -L-rhamnoside 7-O- β -D-glucoside (4), rutin (5), hyperin (6), isoquercitrin (7), quercitrin (8), kaempferol 3-O- α -L-rhamnoside (9), quercetin (10)] も共通して検出された。両者のクロマトを比較したところ、カフェー酸誘導体については、50%エタノール抽出物での検出が大きかった。

分離精製用に調製した 80%エタノール抽出物の分画物 (*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水各分画物) についても HPLC 分析を行った [図 1 (c-f)]。その結果、主要成分である quercitrin のピークは酢酸エチル分画物に顕著に認められた。一方、カフェー酸誘導体は水分画物に認められた。またヘキサン画にも若干のピークが認められたが、いずれもピーク強度が弱いものであった。

3. 抗酸化能の検討

抽出条件による抗酸化能を比較するために、各抽出物 (エタノールおよび 50%エタノール抽出物) について抗酸化活性を評価した。抗酸化能は ORAC 値を指標とした。その結果を図 3 に示す。ORAC 測定の結果、エタノール抽出物よりも 50%エタノール抽出物の方が約 1.5 倍強い抗酸化活性を示した。また成分分布と抗酸化活性の関係を明確にするために、調製した各分画物 (*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水各分画物) についても、同様に ORAC 値を測定した。その結果、酢酸エチル分画物の抗酸化活性が顕著に強く、この分画物に主ピークとして検出された

quercitrin が有効 (指標) 成分である可能性が示唆された。

D. 考察

ドクダミのエタノールおよび 50%エタノール抽出物の HPLC クロマトグラムはいずれも quercitrin (8)が主要成分として検出された。平成 20 年度の報告においても quercitrin が主要成分として確認されており、本結果もそれと同じ結果であった。従って、主成分は既存添加物名簿記載の主成分 isoquercitrin ではなく、quercitrin であることがさらに支持された。また原料の用部について、既存添加物名簿ではドクダミの葉とされている。今回、葉を選別したものを抽出物として調製し、分離、精製用として成分精査したものは地上部を用いた。これら成分分布に大きな違いはなく、用部についてはいずれも可能ではないかと考察された。

抗酸化活性については、50%エタノール抽出物の方が約 1.5 倍強い結果となった。成分分布の違いをみるとカフェー酸の検出が 50%エタノール抽出物の方が多く、それらによるものと考察されたが、抽出物の画分物 (*n*-ヘキサン、酢酸エチル、水各分画物) で抗酸化活性を検討したところ、酢酸エチル分画物の抗酸化能が顕著に強かった。酢酸エチル分画物には抽出物の主成分である quercitrin が主ピークとして検出され、分布が明らかに多いことが示されており、またマイナーピークとしてその他のフラボノール成分の分布も認められた。それゆえ本抗酸化活性には quercitrin を主成分としたこれらフラボノールが寄与していることが示唆された。カフェー酸誘導体は水分画物に分布しており、水分画物にも酢酸エチル分画物ほど顕著ではないが抗酸化活性が認められている。抽出物全体の抗酸化能を考慮した場合、水分画物の収量が多いことを考え合わせると、これらの寄与も示唆される。

以上の結果から、ドクダミ抽出物を調製する場合、エタノールのみで抽出するよりも含水エタノールの方が高抗酸化能であることが示唆され、また指標成分として quercitrin を主成分としたフラボノール類の抽出効率をよくすることで、抗酸化能の向上が計れることが考察された。

E. 結論

酸化防止剤ドクダミ抽出物の製法による成分分布と抗酸化能に関する基礎研究として、ドクダミのエタノール抽出物と 50%エタノール抽出物について比較検討した結果、いずれも主成分として quercitrin が検出された。抗酸化能を ORAC 測定により評価した結果、50%エタノール抽出物の方が高抗酸化能を示した。抽出物の分画物 (*n*-ヘキサン、酢酸エチル、水分画物) について、抗酸化能を評価したところ、酢酸エチル分画物が顕著に強かった。酢酸エチル分画物について含有成分を分析した結果、主成分である quercetin が主成分として検出され、その他のフラボノール成分もマイナー成分として検出された。それゆえ、quercitrin を主成分とするこれらフラボノールが活性成分として抗酸化能に寄与していることが示唆された。

F. 参考文献

- 1) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方，2006，p.1226.
- 2) Meng J, Leung K SY, Jiang Z, Dong X, Zhao Z. Establishment of GC-MS fingerprint of fresh *Houttuynia cordata*, Chem. Pharm. Bull. 2005; 53, 1484-1489.
- 3) Meng J, Leung K SY, Jiang Z, Dong X, Zhao Z, Xu LJ. Establishment of HPLC-DAD-MS fingerprint of fresh *Houttuynia cordata*, Chem. Pharm. Bull. 2005; 53, 1604-1609.
- 4) 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「既存添加物の有効性と品質を確

保するための規格試験の開発(分担報告書
既存添加物ドクダミ抽出物の成分分析).

F. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

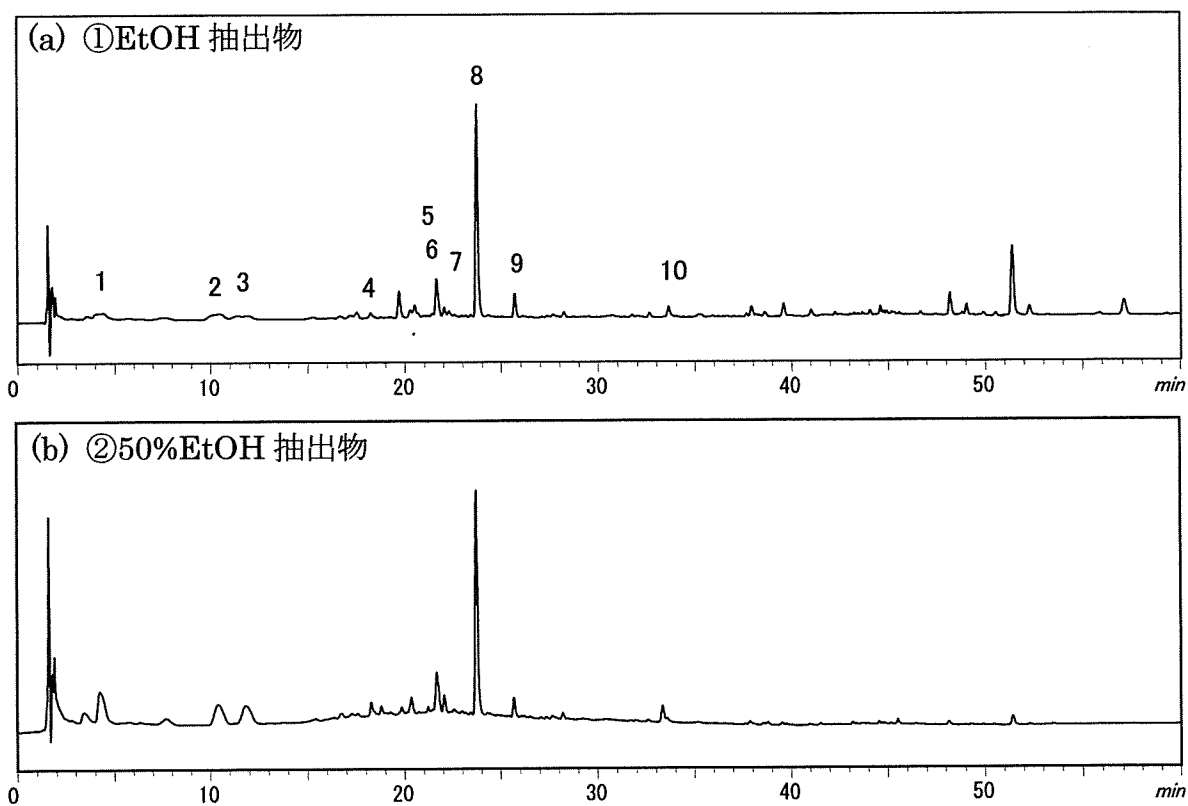


図 1. ドクダミ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長 : 280 nm)
(a) ①エタノール抽出物, (b)②50%エタノール抽出物
(クロマト中の数字は化合物番号を示す)

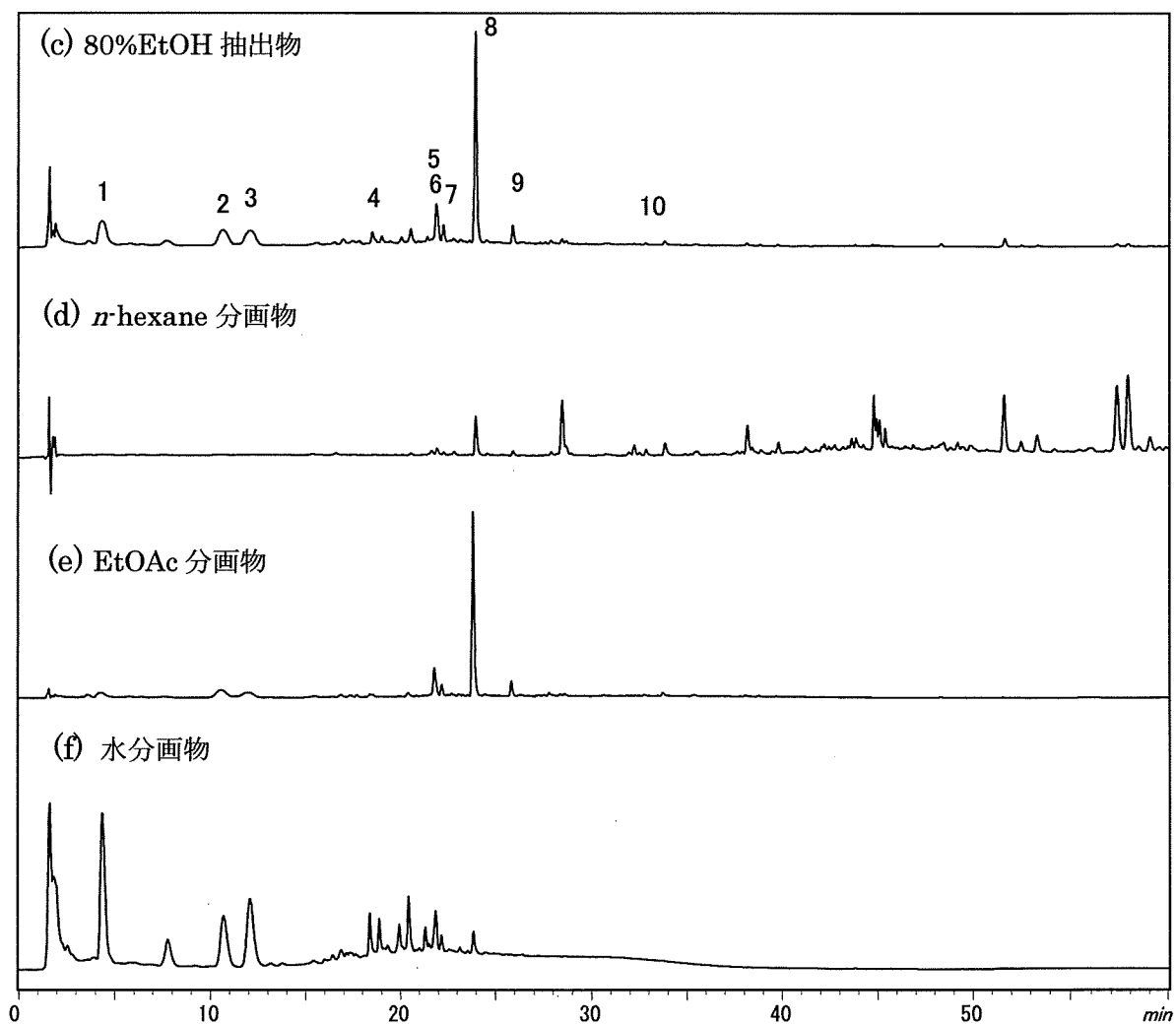


図 1 (続き). ドクダミ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長 : 280 nm)
 (c) 80%エタノール抽出物, (d)80%エタノール抽出物-*n*-ヘキサン分画物,
 (e) 80%エタノール抽出物-酢酸エチル分画物, (f) 80%エタノール抽出物-水分画物
 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

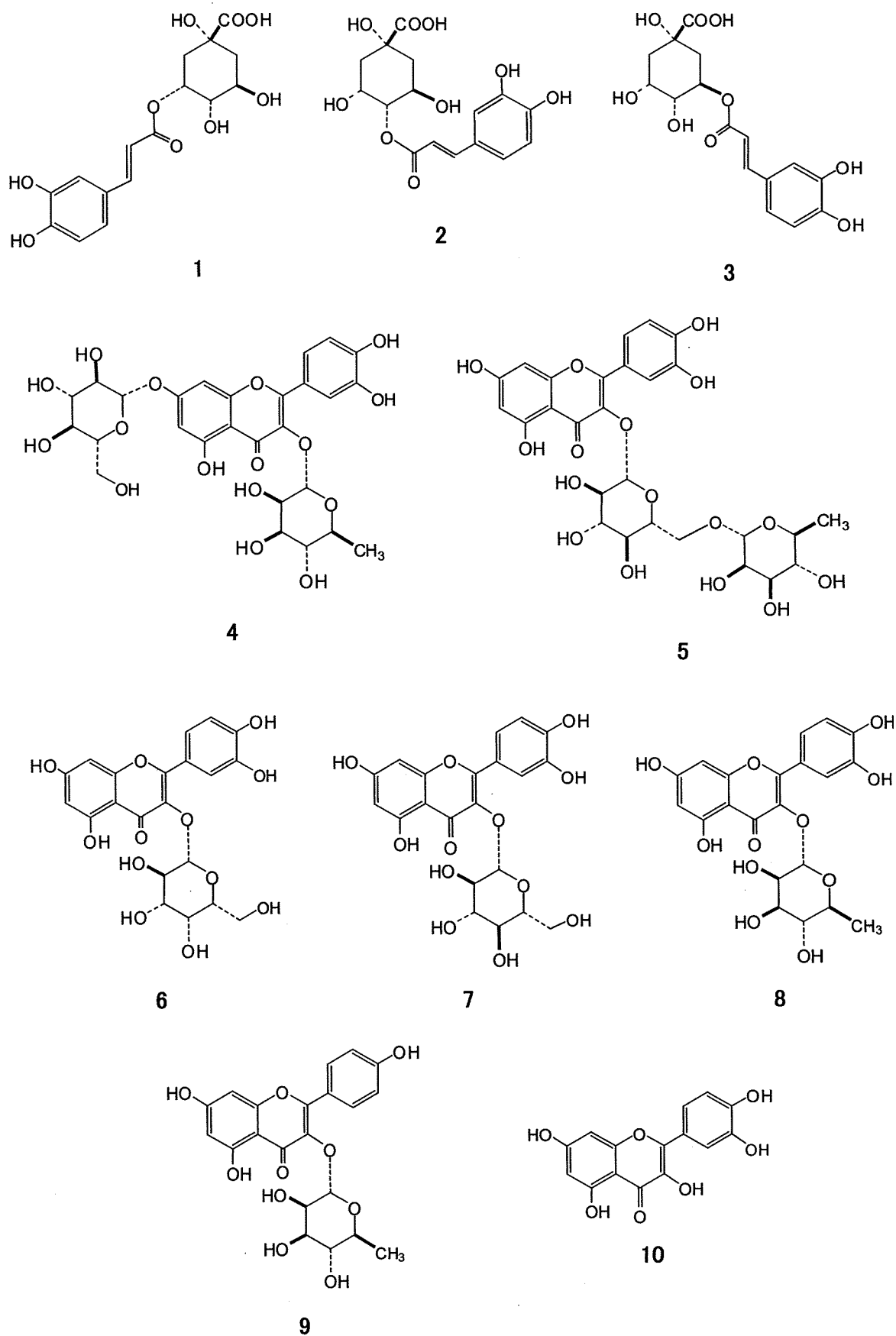


図 2. 化合物 1~10 の化学構造

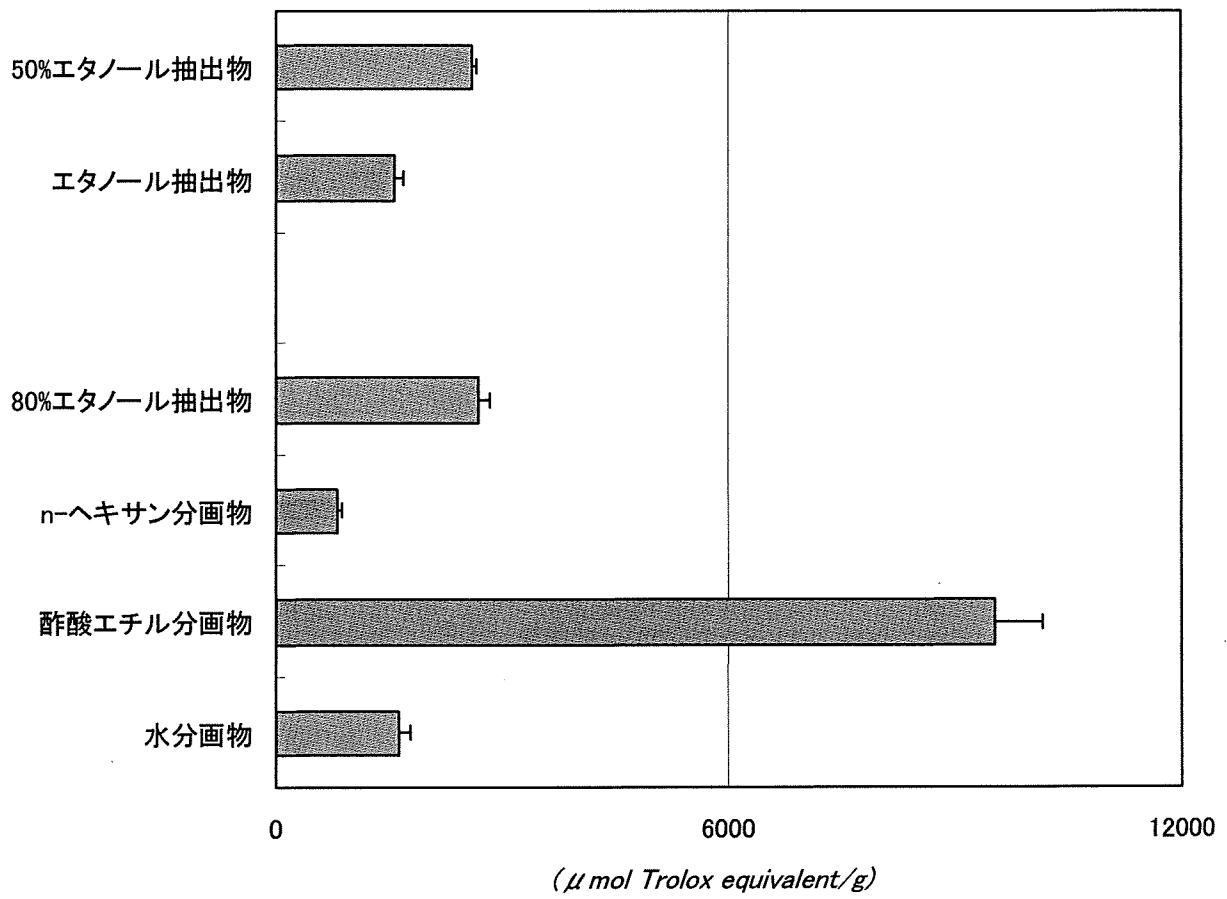


図 3. 各抽出物および分画物の抗酸化活性 (ORAC 値)