

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
ウイキョウ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精油除去ウイキョウ抽出物の製法による成分分布を精査する目的で、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、水蒸気蒸留物除去抽出）による含有成分の比較検討を行った。各抽出物を 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、chlorogenic acid, sinapyl alcohol 1,3'-di-O- β -D-glucoside, syringin, quercetin 3-O- β -D-glucuronide, *p*-anisaldehyde, anethole の計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、未同定化合物が検出され、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（ORAC 測定）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。

研究協力者

吉田隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

ウイキョウは地中海沿岸原産で、別名フェンネルと呼ばれ、香辛料（スパイス）、ハーブとして食用、薬用・香味料などに古くから用いられている。また日本薬局方にウイキョ

ウ（茴香）として収載されており¹⁾、主な薬効として健胃、去痰があげられる。このウイキョウを原料とする添加物精油除去ウイキョウ抽出物は、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「セリ科ウイキョウ（*Foeniculum vulgare* LINNE）の種子を水蒸気蒸留した残渣より、熱時水で抽出し、濃縮して得られたものであ

る。主成分は4-*O*- α -D-グルコシルシナピルアルコールである」と記載されている。

既存添加物精油除去ウイキョウ抽出物については、平成15および16年度の厚生労働科学研究において、主活性成分として4-*O*- β -D-glucosylsynapylalcohol が報告され、その他含有成分として adenosine が明らかにされている^{2,3)}。また基原である *F. vulgare* の含有成分については詳細な検討が行われており、フェノール性化合物、精油類など広い範囲で報告されている。

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、精油除去ウイキョウ抽出物の製法について、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

供試したウイキョウは、長岡香料株式会社から恵与いただいたものを抽出に使用した。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 μ m) (三菱化学)、Toyoparl HW-40 (fine) (東ソー)、YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシィ) 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) (¹H-NMR : 500 MHz, ¹³C-NMR : 126 MHz) により、測定溶媒として dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆) , methanol-*d*₄ (CD₃OD), deuterium oxide (D₂O) 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) (ワイエムシィ), 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) (ワイエムシィ), 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

ウイキョウをブレンダーで粉碎し、その 2 g をエタノール, 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、得られたろ液を濃縮後、凍結乾燥し、各試料 (①50%エタノール, ②エタノール各抽出物) とした。ウイキョウ水蒸気蒸留物については、ウイキ

ヨウ 500 g を水蒸気蒸留し、留出液を塩析して精油 (③水蒸気蒸留物) とした。水蒸気蒸留後の残渣をろ別し、抽出液を減圧濃縮後、凍結乾燥することで精油除去抽出物 (④水蒸気蒸留物除去抽出物) を得た。

分離、精製用の試料は、ウイキョウ (400 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 (3 L)、酢酸エチル (3 L) で順次分画した。各分画物を濃縮し、分画濃縮物 [ヘキサン分画物 (12.9 g)、酢酸エチル分画物 (1.8 g)、水分画物 (32.0 g)] を得た。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) による分離精製を繰り返し、3-*O*-caffeoyl quinic acid (chlorogenic acid) (1) (32 mg), sinapyl alcohol 1,3'-di-*O*-β-D-glucoside (2) (18 mg), syringin (3) (126 mg), quercetin 3-*O*-β-D-glucuronide (4) (54 mg), *p*-anisaldehyde (5) (11 mg), anethole (6) (125 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 μl, 94.4 nM fluorescein/75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 μL, 320 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 溶液 75 μL 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 (μmol TE/g) で表した。

C. 研究結果

1. 含有成分の単離、同定

ウイキョウの 50%エタノール抽出物、エタノール抽出物、水蒸気蒸留物、水蒸気蒸留物除去抽出物について HPLC 分析を行ったところ、図 1 (a-d) 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、ウイキョウの 80%エタノール抽出物について、ヘキサン、酢酸エチル分画物を調製し、これら分画物を得た。図 1 (e-h) に各 HPLC クロマトグラムを示す。各種カラムクロマトによる分離、精製を繰り返し、計 6 種類の化合物を単離することが出来た。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 1-6)。

- 1 : chlorogenic acid (3-*O*-caffeoyl quinic acid)
- 2 : sinapyl alcohol 1,3'-di-*O*-β-D-glucoside
- 3 : syringin
- 4 : quercetin 3-*O*-β-D-glucuronide
- 5 : *p*-anisaldehyde
- 6 : anethole

各化合物の構造式は図 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。

3-*O*-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid)

(1) : ¹H-NMR (CD₃OD) 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 [M-H]⁻.

Sinapyl alcohol 1,3'-di-*O*-β-D-glucoside (2) :
¹H-NMR (CD₃OD) δ 6.76 (2H, s, H-3, 5), 6.60 (1H, brd, *J*=16, H-1'), 6.32 (1H, dt, *J*=5.5, 16,

H-2'), 4.86 (1H, d, $J=7.5$, Glc H-1), 4.45, 4.29 (each 1H, m, H-3'), 4.36 (1H, *d*, $J=8$, Glc H-1'), 3.86 (6H, s, -OMe), 3.78 (2H, dd, $J=1.5$, 12, Glc H-6, 6'), 3.66 (2H, dd, $J=5$, 12, Glc H-6, 6'), 3.50-3.20 (8H, Glc H-2-5, 2'-5'). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 154.4 (2C, C-3, 5), 136.0 (C-1), 135.0 (C-4), 133.4 (C-1'), 126.8 (C-2'), 105.6 (2C, C-2, 6), 105.3 (Glc C-1), 103.5 (Glc C-1'), 78.3, 77.8 (2C), 75.7, 75.4, 75.1, 71.4, 71.3 (Glc C-2-5, 2'-5'), 62.5 (Glc C-6, 6'), 57.1 (-OMe). HR-ESI-MS m/z 533.1860 ([M-H]⁻, Calcd for C₂₃H₃₃O₁₄: 533.1870).

Syringin (3) : $^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD) δ 6.74 (2H, s, H-3, 5), 6.55 (1H, brd, $J=15.5$, H-1'), 6.32 (1H, dt, $J=5.5$, 15.5, H-2'), 4.86 (1H, d, $J=7.5$, Glc H-1), 4.21 (2H, dd, $J=1.5$, 5.5, H-3'), 3.85 (6H, s, -OMe), 3.78 (1H, dd, $J=1.5$, 12, Glc H-6), 3.66 (1H, dd, $J=5$, 12, Glc H-6), 3.48 (1H, dd, $J=7.5$, 9, Glc H-2), 3.41 (2H, m, Glc H-3, 4). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 154.4 (2C, C-2, 3), 135.9 (C-4), 135.3 (C-1), 131.3 (C-1'), 130.0 (C-2'), 105.5 (2C, C-3, 5), 105.3 (Glc C-1), 78.3 (Glc C-5), 77.8 (Glc C-3), 75.7 (Glc C-2), 71.3 (Glc C-4), 63.6 (C-3'), 62.6 (Glc C-6), 57.0 (-OMe). ESI-MS m/z 371 [M-H]⁻.

Quercetin 3-O- β -D-glucuronide (4) : $^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD) δ 7.72 (1H, d, $J=2.5$, H-2'), 7.58 (1H, dd, $J=2.5$, 8.5, H-6'), 6.84 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 6.38 (1H, $J=2$, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2$, H-6), 5.33 (1H, d, $J=7.5$, Glc H-1), 3.70 (1H, d, $J=9.5$, Glc H-5), 3.58 (1H, t, $J=9.5$, Glc H-4), 3.52 (1H, t, $J=9.5$, Glc H-3), 3.48 (1H, dd, $J=7.5$, 9.5, Glc H-2). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 179.2 (C-4), 172.1 (C-6'), 166.0 (C-7), 163.0 (C-5), 159.0 (C-2), 158.5 (C-9), 150.0 (C-4'), 145.9 (C-3'), 136.0 (C-3), 123.2 (C-6'), 122.8 (C-1'), 117.6 (C-2'), 116.1 (C-5'), 105.6 (C-10), 104.4 (Glc C-1), 100.0 (C-6), 94.8 (C-8), 77.8 (Glc C-3, 5), 75.5 (Glc

C-2), 73.1 (Glc C-4). HR-ESI-MS m/z 477.0695 ([M-H]⁻, Calcd for C₂₁H₁₇O₁₃: 477.0669).

***p*-Anisaldehyde (5)** : $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ 9.81 (1H, s, H-7), 7.80 (2H, d, $J=8.5$, H-2, 6), 6.99 (2H, d, $J=8.5$, H-3, 5), 3.84 (3H, s, -OMe). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 190.5 (CHO), 165.2 (C-1), 131.0 (2C, C-3, 5), 129.5 (C-4), 114.2 (2C, C-2, 6), 55.2 (-OMe).

Anethole (6) : $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ 7.25 (2H, d, $J=8.5$, H-2, 6), 6.84 (2H, d, $J=8.5$, H-3, 5), 6.35 (1H, dd, $J=1.5$, 15, H-7), 6.10 (1H, $J=6$, 15, H-8), 3.79 (3H, s, -OMe), 1.88 (3H, dd, $J=1.5$, 6, -Me). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 158.6 (C-1), 130.8 (C-4), 130.4 (C-7), 126.8 (2C, C-3, 5), 123.5 (C-8), 113.8 (C-2, 6), 55.2 (-OMe), 18.2 (-Me).

2. 調製抽出物の成分分布

ウイキョウのエタノール抽出物, 50%エタノール抽出物, 水蒸気蒸留物, 水蒸気蒸留物除抽出物の HPLC クロマトグラムを比較した. 50%エタノール抽出物では2本の主ピークが認められ, それぞれ syringin (3), quercetin 3-O- β -D-glucuronide (4)と同定した. エタノール抽出物からは未同定の主ピークが検出された. これについては現在検討中である. 水蒸気蒸留物除去熱水抽出物については2本の主ピークが検出され, それぞれ, sinapyl alcohol 1,3'-di-O- β -D-glucoside (2), syringin (3), と同定した. 水蒸気蒸留物は1本の主ピークが検出され, 解析の結果, anethole (6)と同定した [図1 (a-d)].

ま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. その結果, *n*-ヘキサン分画物のクロマトグラムは anethole (6)が主ピークとして観察された. 酢酸エチル分画物は syringin (3)がその他のマイナー成分とともに検出された. 水分画

物からは, syringin (3) と, quercetin 3-O- β -D-glucuronide (4)が主ピークとして観察された [図 1 (e-h)].

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, 各調製抽出物 (50%エタノール抽出物, エタノール抽出物, 水蒸気蒸留物, 水蒸気蒸留物除去抽出物) について抗酸化活性を検討した. 抗酸化能は ORAC 値を指標にした. その結果を図 3 に示す. 結果, 全体的に抗酸化活性は弱い傾向にあった. そのうち, 50%エタノール抽出物が最も抗酸化活性が強く, 次いで水蒸気蒸留物除去抽出物で活性が認められた. また各分画物 (*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かった.

D. 考察

今回, 供試した抽出物においては, 全体的に抗酸化活性は顕著に認められなかった. 検討した抽出物の中で抗酸化活性が強かったものは 50%エタノール抽出物と水蒸気蒸留物除去抽出物で, それらの HPLC クロマトグラムは成分としてはいずれからも sinapyl alcohol 1,3'-di-O- β -D-glucoside (2), syringin (3), quercetin 3-O- β -D-glucuronide (4)が認められた. 平成 16 年度の報告においても syringin (synapyl alcohol 4-O- β -D-glucoside)が主要成分 (主活性成分) として確認されており, 本結果においても主要な 1 成分として同定された. また sinapyl alcohol の配糖体について, 既存添加物名簿では α 体として記載されているが, β 体であることが本研究においても確認された. 従って, 既存添加物名簿収載の主成分は sinapyl alcohol の β -D-glucoside とすべきで, α 体はその存在が確認できなかったことから含有しても極めて微量であることが示唆された.

抗酸化活性については, 検討した中で 50%エタノール, 水蒸気蒸留物除去抽出物が比較的強い結果となった. 他の抽出物と成分分布の違いをみると, sinapyl alcohol 1,3'-di-O- β -D-glucoside (2), syringin (3), quercetin 3-O- β -D-glucuronide (4)の検出によるところが大きく, それらの寄与が考察された. 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) で抗酸化能を検討したところ, 酢酸エチル画分の抗酸化能が強かった. 酢酸エチル画分には主ピークの一つとして syringin (3)が検出され, その他, マイナー成分が多数検出された. 現在, これらマイナー成分について検討中である.

以上の結果から, ウイキョウ抽出物を調製する場合, 含水条件下で抽出することが主成分の抽出効率をよくすることが考えられ, 抗酸化能の向上も計れることが考察された. また水蒸気蒸留物の抗酸化活性はほとんど認められず, 精油を除去することにより抗酸化活性が高められることも確認された.

E. 結論

ウイキョウ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, ウイキョウを原料としてエタノール抽出物, 50%エタノール抽出物, 水蒸気蒸留物, 水蒸気蒸留物除去抽出物について, 抗酸化能および成分分布について検討した結果, 抗酸化活性の強かった 50%エタノール抽出物および水蒸気蒸留物除去熱水抽出物から sinapyl alcohol 1,3'-di-O- β -D-glucoside (2), syringin (3), quercetin 3-O- β -D-glucuronide (4)が検出された. 抽出物の分画物について, 抗酸化能を評価したところ, 主成分の一つである syringin (3)を含む酢酸エチル分画物が強かった. 他成分もマイナー成分も検出されており, 現在, それらについて検討中であり, これら成分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.1179.
- 2) 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
研究報告書「既存添加物の安全性確保上
必要な品質問題に関する研究（分担報告
書「タデ抽出物」および「精油除去ウイ
キョウ」の成分探索）.
- 3) 平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金
研究報告書「既存添加物の安全性確保上
必要な品質問題に関する研究（分担報告
書 精油除去ウイキョウに含有される成
分に関する研究）.

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

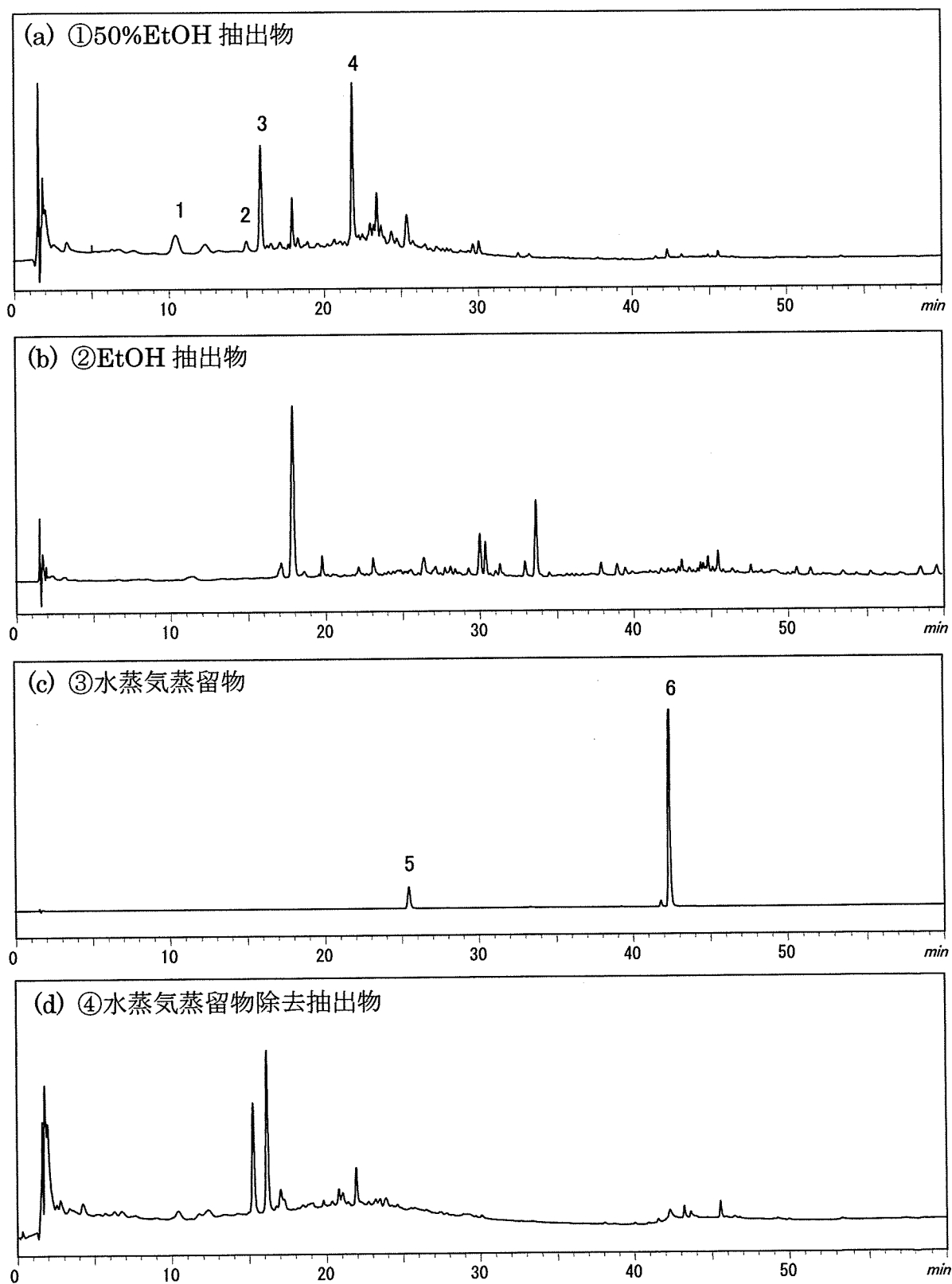


図 1. ウイキョウ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長: 280 nm)
 (a) ①50%エタノール抽出物, (b) ②エタノール抽出物, (c) ③水蒸気蒸留物,
 (d) ④水蒸気蒸留物除去抽出物
 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

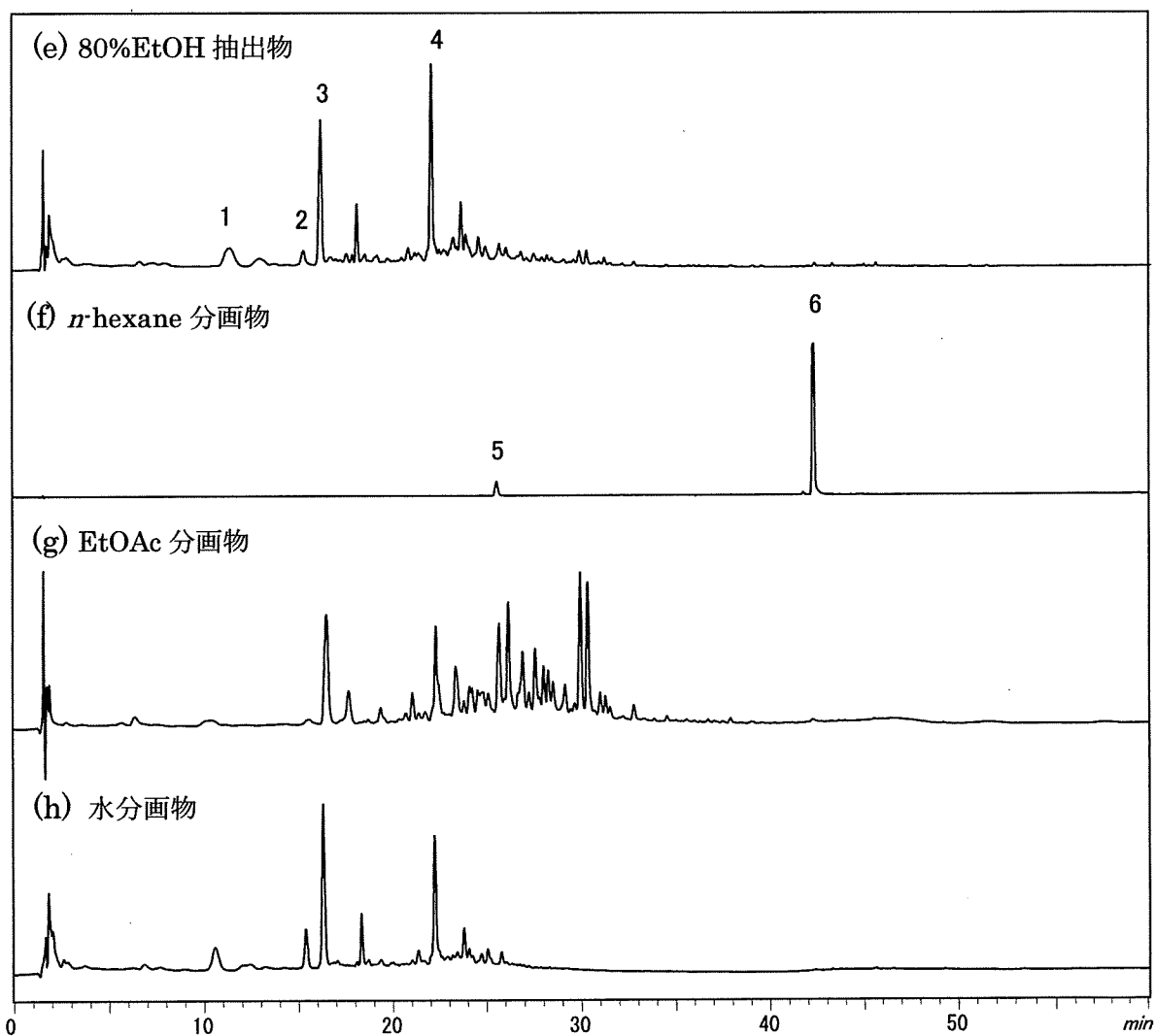


図 1 (続き). ウイキョウ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長: 280 nm)
 (e) 80%エタノール抽出物, (f) 80%エタノール抽出物-*n*-ヘキサン分画物,
 (g) 80%エタノール抽出物-酢酸エチル分画物, (h) 80%エタノール抽出物-水分画物
 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

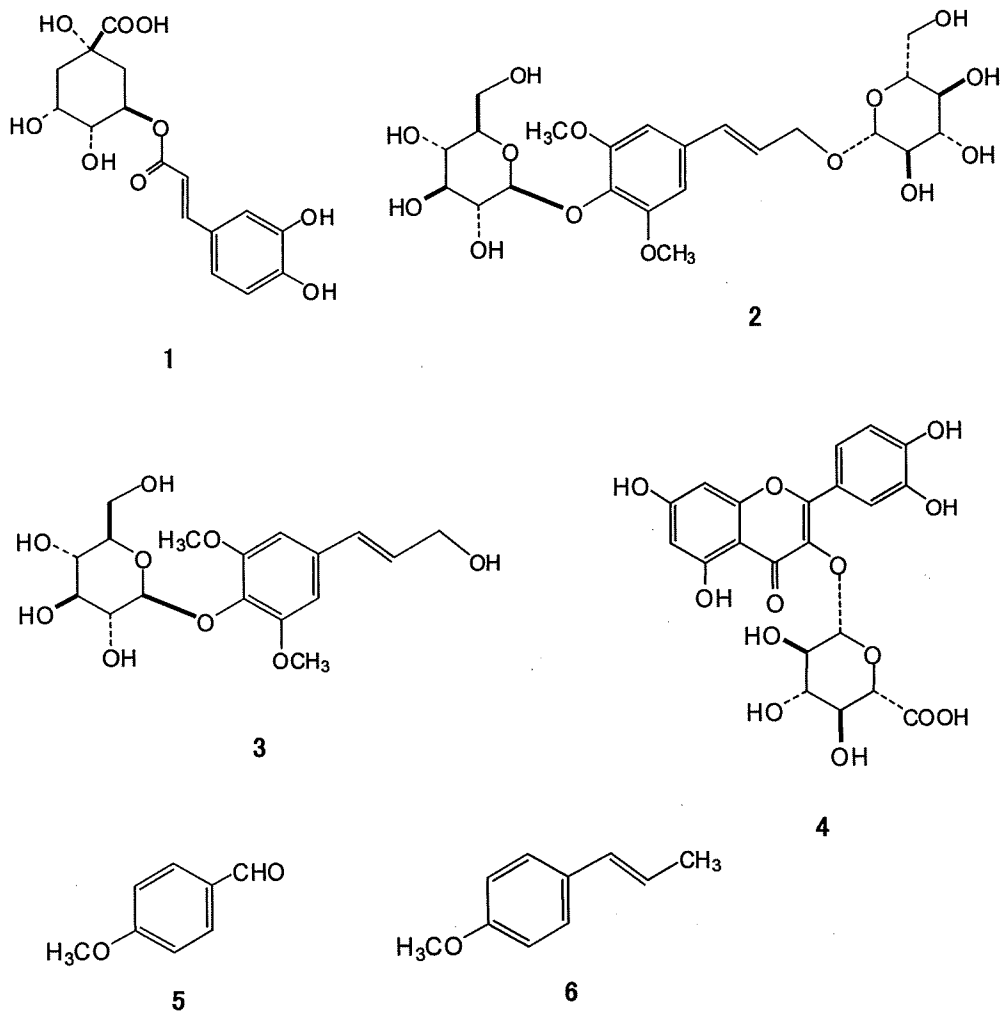


図 2. 化合物 1~6 の化学構造

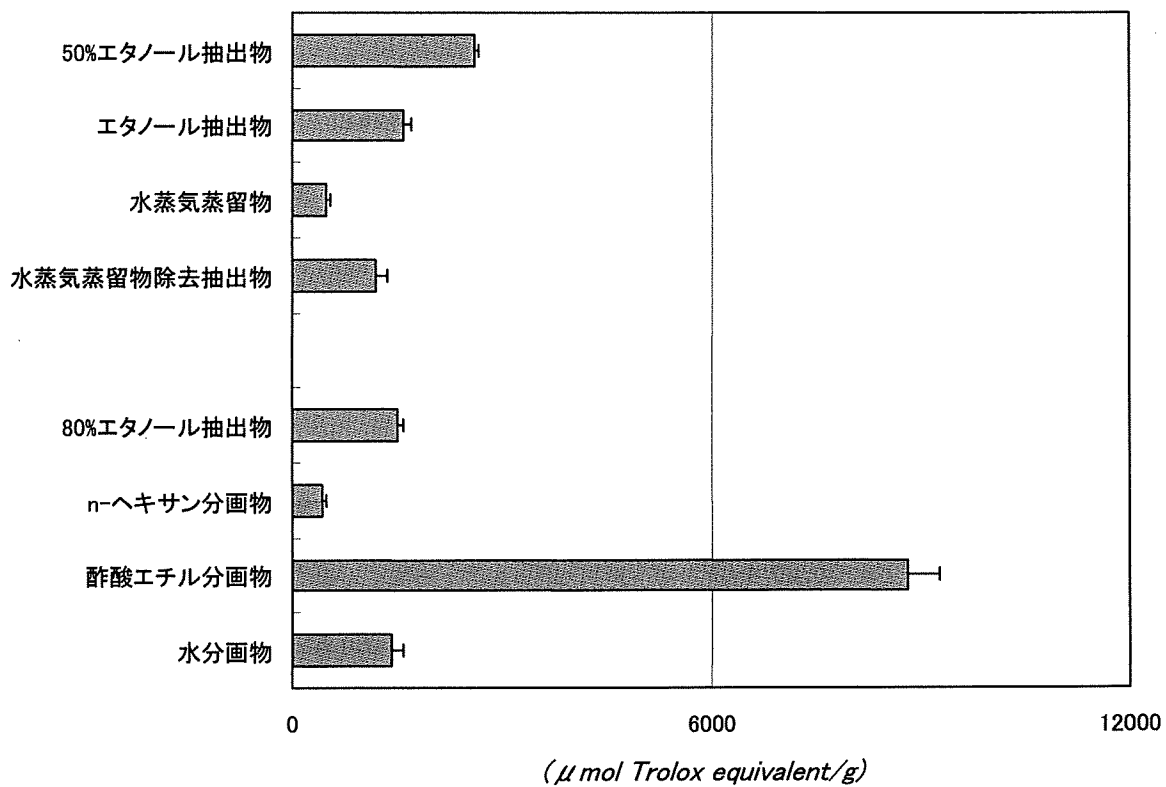


図 3. 各抽出物および分画物の抗酸化活性 (ORAC 値)

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
セージ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セージ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、エタノール、*n*-ヘキサン、水抽出による含有成分の比較検討を行った。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, luteolin 7-*O*- β -D-glucuronide, scutellarein の他、vicenin-2, cirsimaritin, salvigenin の計 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 (ORAC 測定) 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、rosmarinic acid が主ピークとして検出され、有効 (指標) 成分の一つ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

セージは、地中海沿岸を原産地とし、欧米では古くから家庭用ハーブとして栽培されている。葉を乾燥したものをサルビア葉といい、以前は咽喉炎のうがい薬や胃腸炎に薬用としたが、現在ではスパイス (香辛料) としての使用がほとんどである。このセージを原料とする食品添加物セージ抽出物は、既存添

加物名簿記載品目リストに、用途は酸化防止剤、基原・製法・本質は「シソ科サルビア (*Salvia officinalis* LINNE) の葉より、水、エタノール又はヘキサンで抽出して得られたものである。有効成分はフェノール性ジテルペノイド (ジテルペン) 及びカルノシン酸である」と記載されている。セージ中の成分については幅広く研究されており、フラボノイド (apigenin, luteolin など)、カフェー酸誘導体 (rosmarinic acid, chlorogenic acid など)、リグナン (pinosresinol 類など) などのフェノ

ール性化合物¹⁾, 精油類 (camphor, cineole など)²⁾, ジテルペン類 (carnosol, carnosic acid など)³⁾などが報告されている。

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, セージ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

供試したセージは, 長岡香料株式会社から恵与いただいたものを抽出に使用した。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 μ) (三菱化学), Toyopearl HW-40 (fine) (東ソー), YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシィ) 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) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) により, 測定溶媒として dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆), methanol-*d*₄ (CD₃OD), deuterium oxide (D₂O) 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) (ワイエムシィ), 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) (ワイエムシィ), 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

セージの乾燥葉を粉碎し, その 2 g を 50% エタノール [エタノール-水 (1:1)], エタノール, ヘキサン, 水をそれぞれ 40 mL 加え, 20 分間超音波処理した。抽出液を吸引ろ過し, 得られたろ液を濃縮後, 凍結乾燥し, 各試料 (①50%エタノール, ②エタノール, ③ヘキサン, ④水各抽出物) とした。

分離, 精製用の試料は, セージ (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)] (7 L) で抽出後, *n*-ヘキサン (2 L), 酢酸エチル (2 L) で順次分画した。各分画物を濃縮し, 分画濃縮物 [ヘキサン分画物 (26.0 g), 酢酸エチル分画物 (9.7 g), 水分画物 (45.0 g)] を得た。*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水各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) による分離精製を繰り返し, vicenin-2 (1) (4 mg), luteolin 7-*O*- β -D-glucuronide (2) (6 mg), scutellarein (3) (5 mg), rosmarinic acid (4) (95 mg), cirsimaritin (5) (4 mg), salvigenin (6) (5 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

セージの 50% エタノール, エタノール, ヘキサン, 水各抽出物について HPLC 分析を行ったところ, 図 1 (a-d) 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, セージの 80% エタノール抽出物について, ヘキサン, 酢酸エチル分画物を調製し, これら分画物を得た. 図 1 (e-h) に各 HPLC クロマトグラムを示す. 各種カラムクロマトによる分離, 精製を繰り返し, 計 6 種類の化合物を単離することが出来た. 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 1-6).

- 1 : vicenin-2 (apigenin 6,8-di-C- β -D-glucoside)
- 2 : luteolin 7-*O*- β -D-glucuronide
- 3 : scutellarein (6-hydroxy apigenin)
- 4 : rosmarinic acid
- 5 : cirsimaritin
(4', 5-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone)
- 6 : salvigenin
(5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone)

各化合物の構造式は図 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.

Vicenin-2 (Apigenin 6,8-di-C- β -D-glucoside)

(1) : $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7.97 (2H, d, $J=8$, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, $J=8$, H-3', 5'), 6.61 (1H, s, H-3), 4.90-4.75 (2H, m, Glc H-1, 1'), 4.00-3.00 (10H, Glc H-2-6, 2'-6'). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 182.5 (C-4), 164.0 (C-2), 163.0 (C-7), 161.5 (C-4'), 159.7 (C-5), 155.5 (C-9), 129.0 (C-2', 6'), 122.0 (C-1'), 116.3 (C-3', 5'), 109.0 (C-6), 104.8 (C-10), 104.6 (C-8), 103.0 (C-3), 82.0, 81.5 (Glc C-5, 5'), 78.9, 78.8 (Glc C-3, 3'), 74.4, 73.5 (Glc C-1, 1'), 71.5, 71.3 (Glc C-2, 2'), 70.0, 69.9 (Glc C-4, 4'), 61.1, 61.0 (Glc C-6, 6'). ESI-MS m/z 593 [M-H] $^-$.

Luteolin 7-*O*- β -D-glucuronide (2) : $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7.38 (1H, dd, $J=2.5, 8.5$, H-6'), 7.35 (1H, d, $J=2.5$, H-2'), 6.76 (1H, dd, $J=2.5, 8.5$, H-5'), 6.74 (1H, $J=2$, H-8), 6.40 (1H, d, $J=2$, H-6), 5.00 (1H, d, $J=7.5$, Glc H-1), 3.50 (1H, d, $J=9.5$, Glc H-5), 3.28 (1H, t, $J=9.5$, Glc H-3), 3.25 (1H, brt, $J=9.5$, Glc H-2), 3.18 (1H, brt, $J=9.5$, Glc H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 181.6 (C-4), 171.6 (Glc C-6), 164.8 (C-2), 162.9 (C-7), 161.0 (C-5), 156.9 (C-9), 147.4 (C-4'), 146.4 (C-3'), 119.4 (C-1), 119.4 (C-6'), 115.9 (C-5'), 112.5 (C-2'), 105.1 (C-10), 102.1 (C-3), 99.7 (Glc

C-1), 99.5 (C-8), 94.5 (C-6), 76.6 (Glc C-3), 73.6 (Glc C-5), 73.0 (Glc C-2), 72.0 (Glc C-4). ESI-MS m/z 461 [M-H].

Scutellarein (6-Hydroxy apigenin) (3) : $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7.91 (2H, d, $J=9$, H-2', 6'), 6.95 (2H, d, $J=9$, H-3', 5'), 6.92, 6.80 (each 1H, s, H-3, 8). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 181.6 (C-4), 163.5 (C-2), 161.0 (C-4'), 153.3 (C-9), 149.6 (C-7), 147.0 (C-5), 129.0 (C-6), 128.3 (C-2', 6'), 121.5 (C-1'), 116.2 (C-3', 5'), 104.0 (C-10), 102.2 (C-3), 93.8 (C-8). ESI-MS m/z 285 [M-H].

Rosmaninic acid (4) : $^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD) δ 7.55 (1H, d, $J=15.5$, H-7), 7.03 (1H, d, $J=1.5$, H-2), 6.93 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6), 6.75 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.70 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.61 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6'), 6.24 (1H, d, $J=15.5$, H-8), 5.19 (1H, dd, $J=4$, 8, H-8'), 3.10, (1H, dd, $J=8$, 14.5, H-7'), 3.01 (1H, dd, $J=4$, 14.5, H-7'). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 173.5 (C-9'), 168.4 (C-9), 149.6 (C-4), 147.7 (C-7), 146.7 (C-3), 146.0 (C-3'), 145.1 (C-4'), 129.3 (C-1'), 127.6 (C-1), 123.1 (C-6), 121.8 (C-6'), 117.6 (C-2'), 116.5 (C-5'), 116.3 (C-5), 115.2 (C-2), 114.4 (C-8), 74.7 (C-8'), 37.8 (C-7'). ESI-MS m/z 359 [M-H].

Scutellarein (6-Hydroxy apigenin) (5) : $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7.91 (2H, d, $J=9$, H-2', 6'), 6.95 (2H, d, $J=9$, H-3', 5'), 6.92, 6.80 (each 1H, s, H-3, 8). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 181.6 (C-4), 163.5 (C-2), 161.0 (C-4'), 153.3 (C-9), 149.6 (C-7), 147.0 (C-5), 129.0 (C-6), 128.3 (C-2', 6'), 121.5 (C-1'), 116.2 (C-3', 5'), 104.0 (C-10), 102.2 (C-3), 93.8 (C-8). ESI-MS m/z 285 [M-H].

Salvigenin

(5-Hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone) (6) : $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ 7.84 (2H, d, $J=9$, H-2', 6'), 7.04 (2H, d, $J=9$, H-3', 5'), 6.60, 6.55 (each 1H, s,

H-3, 8), 3.97, 3.93, 3.90 (each 3H, -OMe). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 182.9 (C-4), 164.5 (C-2), 163.0 (C-4'), 159.1 (C-7), 153.4 (2C, C-5, 9), 131.9 (C-6), 128.5 (2C, C-2', 6'), 123.9 (C-1'), 115.0 (C-3', 5'), 106.5 (C-10), 104.6 (C-3), 90.8 (C-8), 61.3, 56.8, 55.5 (each 3H, -OMe). ESI-MS m/z 327 [M-H].

2. 調製抽出物の成分分布

セージの各抽出物 (50%エタノール, エタノール, *n*-ヘキサン, 水各抽出物) の HPLC クロマトグラムを比較したところ, 50%エタノールおよび水抽出物で保持時間 22, 24 分付近にそれぞれ主ピークが検出された。これらピークを解析したところ, luteolin 7-*O*- β -D-glucoside (2), scutellarein (3), rosmarinic acid (4) と同定された [図 1 (a, d)]。なお保持時間 22 分付近には未同定な 1 化合物が重複しており, それについては現在検討中である。これらはエタノール抽出物にも検出されたが, 2 抽出物と比べて低検出であった。一方, *n*-ヘキサン抽出物においてこれらはほとんど検出されなかった。ま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。その結果, 酢酸エチル分画物のクロマトグラムは rosmarinic acid が主ピークとして観察された。また水分画物もフラボノイドとともに rosmarinic acid のピークが認められた [図 1 (g, h)]。

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, 各調製抽出物 (50%エタノール, エタノール, *n*-ヘキサン, 水各抽出物) について抗酸化活性を検討した。抗酸化能は ORAC 値を指標にした。その結果を図 3 に示す。結果, 50%エタノール抽出物の抗酸化活性が強く, 次いで水抽出物であった。エタノール抽出物

と比較し含水となった 50%エタノール抽出物では約 2 倍強い抗酸化活性を示した。また各分画物 (*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強く, 次いで水分画物が活性を示した。

D. 考察

検討したセージ抽出物の中で抗酸化活性の強かった 50%エタノールおよび水抽出物の HPLC クロマトグラムはいずれも rosmarinic acid (4) が主成分として検出された。これは以前にセージの抗酸化成分としての報告があり, 本結果もそれと同じような結果であった。その他, rosmarinic acid 以外に抗酸化活性が示唆されるフラボノイドの含有も確認され, 活性に寄与していることも考えられる。製法としては, 有機溶媒のみよりも, rosmarinic acid やフラボノイドの抽出効率が低い含水溶剤の方が抗酸化活性の向上を計れることが考察される。

一方で, rosmarinic acid の含有がほとんど認められなかった *n*-ヘキサン画分においても若干の抗酸化活性が認められた。この画分には既存添加物名簿記載の有効成分 carnosol や carnosic acid などのジテルペンの含有が示唆される。これらは以前に抗酸化成分として報告がされており, その活性によるものと考えられる。この画分については, 本研究においても現在検討中であるが, 酢酸エチルや水画分の方の抗酸化活性が強く, 抽出物全体として考慮した場合, rosmarinic acid やフラボノイドが主有効成分として考察される。

セージ抽出物の既存添加物名簿の記述については, 「有効成分はフェノール性ジテルペノイド (ジテルペン) 及びカルノシン酸である」と記載されている。一方でカルノシン酸もフェノール性ジテルペンであるため, 「カルノシン酸などのフェノール性ジテルペノイド (ジテルペン) である」などの検討

が必要であると考えられる。

E. 結論

酸化防止剤セージ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, セージのエタノール, 50%エタノール, *n*-ヘキサン, 水各抽出物について検討した結果, 50%エタノールおよび水抽出物の主成分として rosmarinic acid, およびフラボノイドが検出された。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抗酸化能が強かった。抽出物の分画物について, 抗酸化能を評価したところ, 酢酸エチル分画物が強く, 含有成分を精査した結果, 主成分である rosmarinic acid が検出され, luteolin 7-*O*- β -D-glucoside などのフラボノイドも本画分に検出された。それゆえ, rosmarinic acid とともにフラボノイドも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。またこれらフェノール性化合物がほとんど検出されなかった *n*-ヘキサン抽出物においても若干の抗酸化活性が認められた。これは含有するジテルペンによるものと考えられる。

F. 参考文献

- 1) Lu Y, Foo LY. Polyphenolics of salvia-a review, *Phytochemistry* 2002; 59, 117–140.
- 2) Cuvelier ME, Berset C, Richard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.* 1994; 42, 665–669.
- 3) Farhat MB, Jordan MJ, Chaouech-Hamada R, Landoulso A, Sotomayor JA. Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of Tunisian cultivated *Salvia officianlis* L. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57, 10349–10356

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

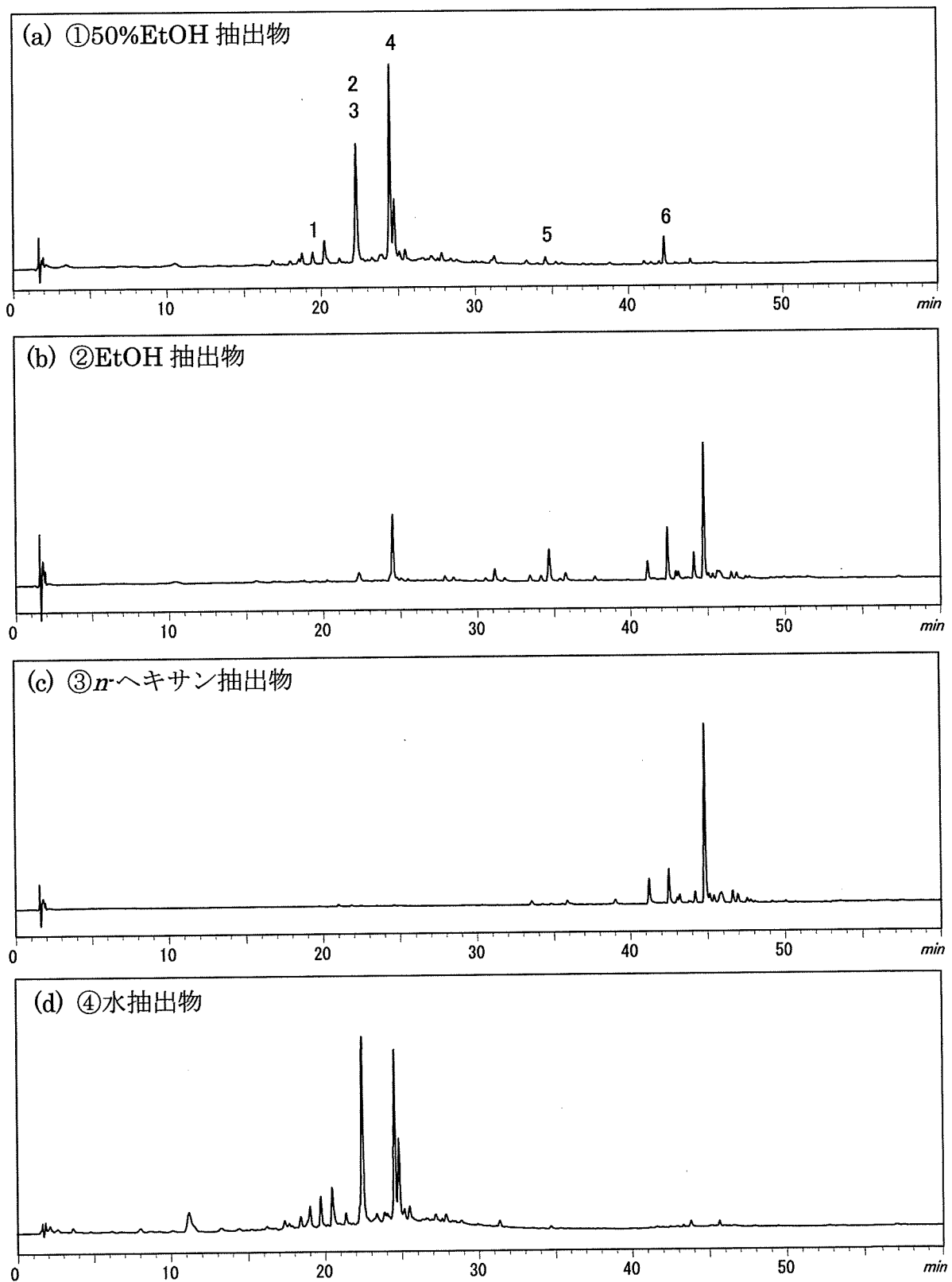


図 1. セージ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長 : 280 nm)
 (a) ①50%エタノール抽出物, (b) ②エタノール抽出物, (c) ③*n*-ヘキサン抽出物, (d) ④水抽出物
 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

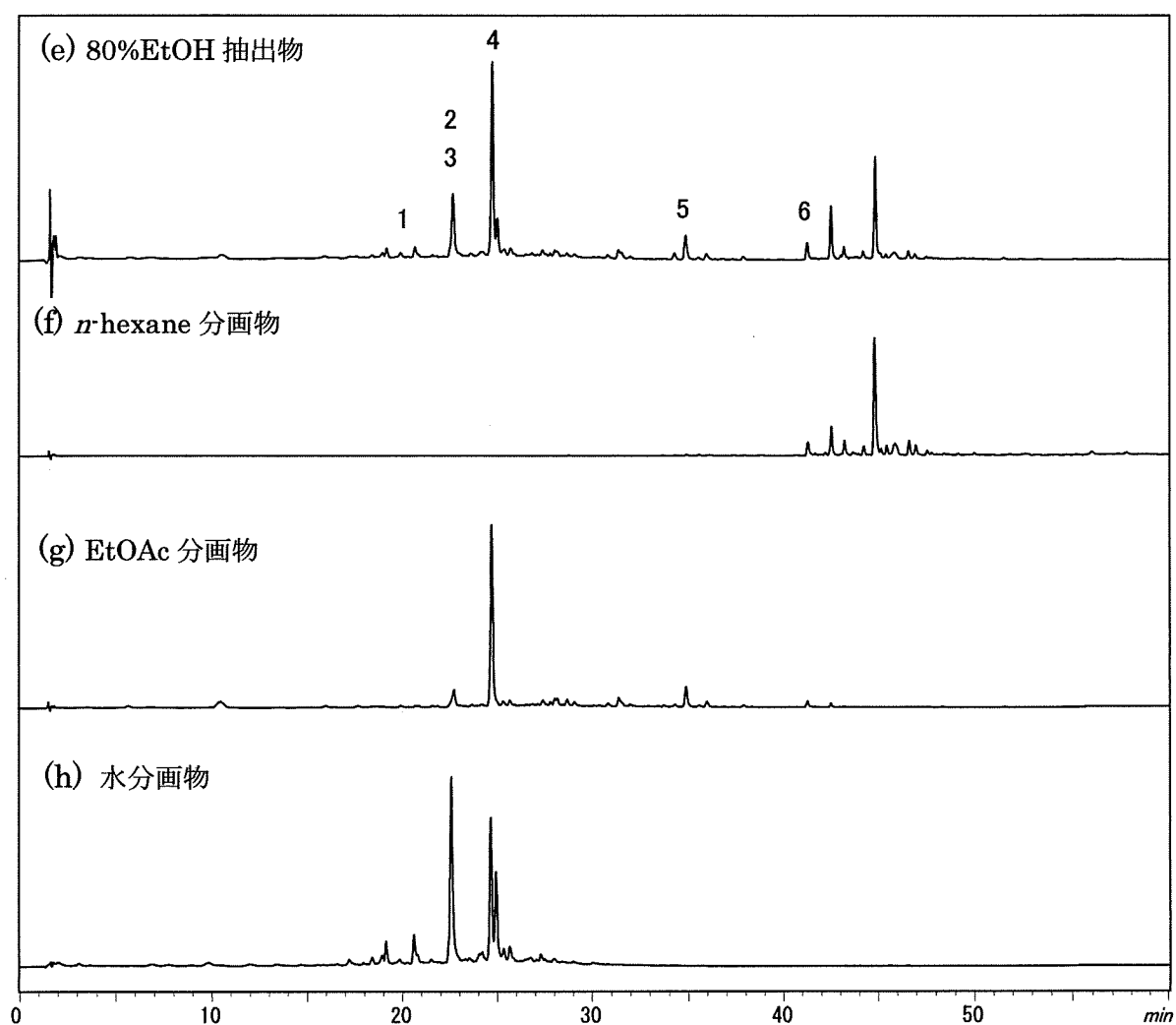


図1 (続き). セージ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長 : 280 nm)
 (e) 80%エタノール抽出物, (f) 80%エタノール抽出物-*n*-ヘキサン分画物,
 (g) 80%エタノール抽出物-酢酸エチル分画物, (h) 80%エタノール抽出物-水分画物
 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

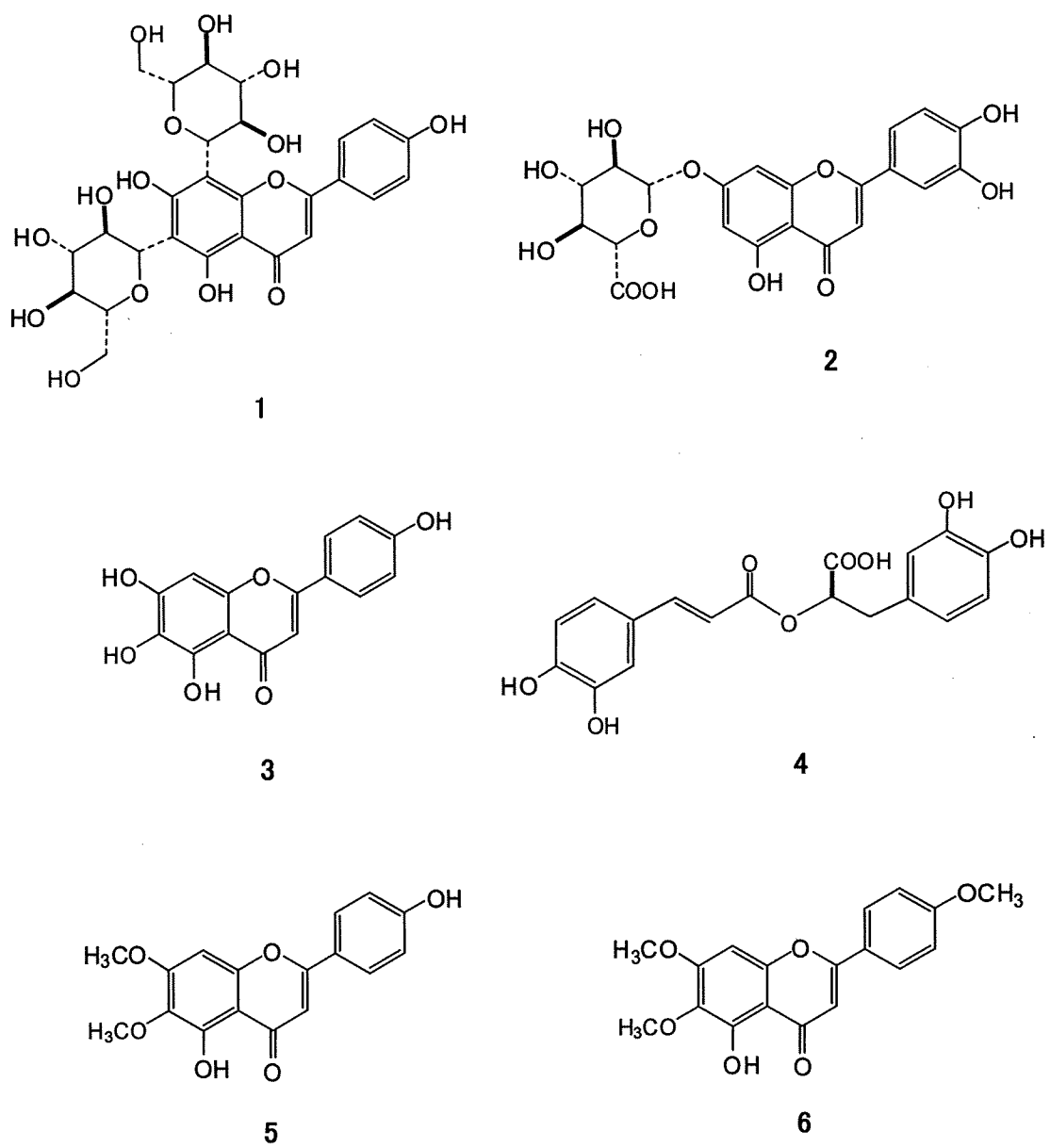


図 2. 化合物 1~10 の化学構造

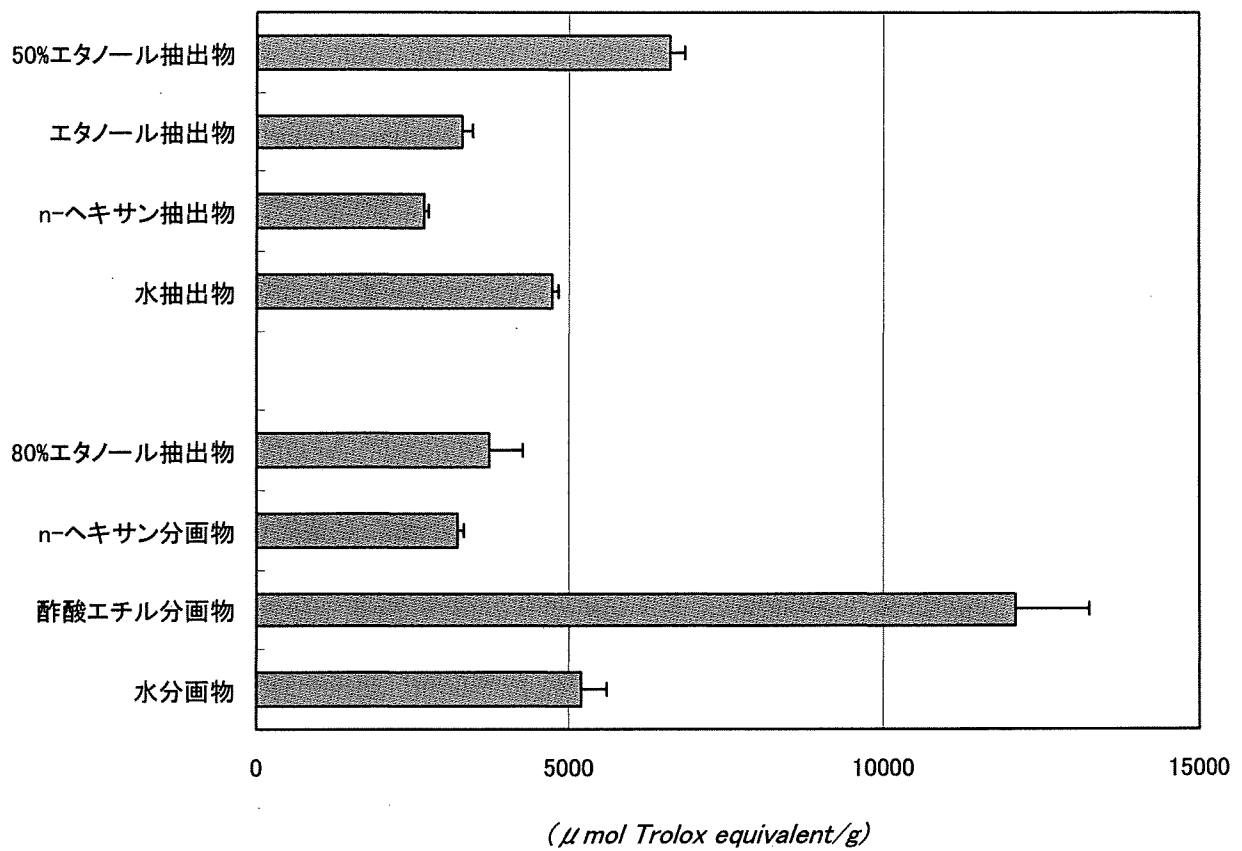


図 3. 各抽出物および分画物の抗酸化活性 (ORAC 値)