

C-1), 100.0 (C-6), 94.8 (C-8), 77.3 (GlcA C-5), 77.1 (GlcA C-3), 75.3 (GlcA C-2), 72.7 (GlcA C-4), 52.8 (-OMe).

1,2,3-Tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (**11**):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.03, 7.02, 6.91 (each 2H, s, galloyl-H), 6.04 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, Glc H-1), 5.52 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, Glc H-3), 5.40 (1H, dd,  $J = 8.5, 10.0$  Hz, Glc H-2), 3.92 (1H, dd,  $J = 2.5, 12.5$  Hz, Glc H-6), 3.87 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, Glc H-4), 3.80 (1H, dd,  $J = 5.0, 12.5$  Hz, Glc H-6), 3.69 (1H, ddd,  $J = 2.5, 5.0, 10.0$  Hz, Glc H-5).

1,2,3,6-Tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (**12**):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.12, 7.03, 7.02, 6.93 (each 2H, s, galloyl-H), 6.09 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Glc H-1), 5.57 (1H, dd,  $J = 8.5, 9.0$  Hz, Glc H-3), 5.44 (1H, dd,  $J = 8.5, 9.5$  Hz, Glc H-2), 4.61 (1H, dd,  $J = 2.0, 12.0$  Hz, Glc H-6), 4.51 (1H, dd,  $J = 4.5, 12.0$  Hz, Glc H-6), 4.01 (1H, ddd,  $J = 2.0, 4.5, 9.5$  Hz, Glc H-5), 3.96 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, Glc H-4).

Strictinin (**13**):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.14 (2H, s, galloyl-H), 6.69, 6.55 (each 1H, s, HHDP-H), 5.67 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Glc H-1), 5.22 (1H, dd,  $J = 6.0, 13.0$  Hz, Glc H-6), 4.85 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, Glc H-4), 4.03 (1H, dd,  $J = 6.0, 9.5$  Hz, Glc H-5), 3.81 (1H, d,  $J = 13.0$  Hz, Glc H-6), 3.71 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, Glc H-3), 3.61 (1H, dd,  $J = 8.0, 9.5$  Hz, Glc H-2).

Casuarictin (**14**):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.11 (2H, s, galloyl-H), 6.62, 6.52, 6.43, 6.39 (each 1H, s, HHDP-H), 6.13 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, Glc H-1), 5.45 (1H, dd,  $J = 9.0, 10.5$  Hz, Glc H-3), 5.36 (1H, dd,  $J = 6.5, 13.5$  Hz, Glc H-6), 5.19 (2H, m, Glc H-2, 4), 4.36 (1H, m, Glc H-5), 3.89 (1H, d,  $J = 13.5$  Hz, Glc H-6).

Tellimagrandin II (**16**):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 7.05, 6.95, 6.92 (each 2H, s, galloyl-H), 6.62, 6.50 (each 1H, s, HHDP-H), 6.11 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Glc H-1), 5.76 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, Glc H-3), 5.54 (1H, dd,  $J = 8.0, 9.5$  Hz, Glc H-2), 5.37 (1H, dd,  $J = 6.5, 13.5$  Hz, Glc H-6), 5.23 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, Glc H-4), 4.42 (1H, dd,  $J = 6.5, 9.5$  Hz, Glc H-5), 3.92 (1H, d,  $J = 13.5$  Hz, Glc H-6).

6'-*O*-Acetylisobiflorin (**17**):  $^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 6.24 (1H, s, H-6), 6.08 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz, H-3), 4.89 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, Glc H-1), 4.39 (1H, dd,  $J = 1.5, 12.0$  Hz, Glc H-6), 4.21 (1H, dd,  $J = 5.5, 12.0$  Hz, Glc H-6), 4.08 (1H, br t, Glc H-2), 3.59 (1H, br t, Glc H-5), 3.45-3.47 (2H, m, Glc H-3, 4), 2.40 (3H, d,  $J = 1.0$  Hz, 2-Me), 2.03 (3H, s, ester carbonyl).  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 184.3 (C-4), 172.9 (-OAc), 169.2 (C-2), 164.7 (C-7), 162.9 (C-5), 158.3 (C-8a), 108.8 (C-3), 105.3 (C-4a), 104.5 (C-8), 99.9 (C-6), 79.8 (Glc C-3), 79.6 (Glc C-5), 75.4 (Glc C-1), 72.7 (Glc C-2), 71.8 (Glc C-4), 65.3 (Glc C-6), 20.7 (acetyl methyl), 20.3 (2-Me).

HR-ESI-MS: 395.0962 (Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$ : 395.0984).

### 3. 化合物 17 の構造解析

化合物 **17** は淡黄色無晶形粉末として得られ、HR-ESI-MS の測定の結果から分子量は  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$  であることが示された。

$^1\text{H-NMR}$  スペクトル (図 4) では芳香族プロトン領域に 1H-singlet が 1 本、アリルカップリングと推察される doublet ( $J = 0.5$  Hz) が 1 本観察された。脂肪族プロトン領域にはアセチル基由来の 3H-singlet が 1 本、オレフィンメチル由来の 3H-doublet ( $J = 0.5$  Hz) に加えてグルコース 1 組のシグナルを認めた。脂肪族プロトン領域にはグルコース 1 つ分のシグナルが観察され、また、その 6 位のプロトンは他と比べて大きく低磁場シフト

(COSY) (図5) で示されたことから、この位置がアシル化されていると推察された。

<sup>13</sup>C-NMR スペクトル (図6) では脂肪族領域にアセチル基、オレフィンメチル、グルコース1組由来のシグナルが観察され、また heteronuclear single quantum coherence (HSQC, 図7) の測定及び <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY の結果、グルコースの1位が 75.4 ppm に観察されたことから、糖とアグリコンとが C-C 結合している可能性が示唆された。以上の情報から、本化合物は biflorin (6) あるいは isobiflorin (7) の6位にアセチル基が結合した構造であると推察された。

構造の確証を得る目的で heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) の測定を行った結果、図8に示す相関が観察されたことから、アセチル基はグルコースの6位に結合していることが確認された。また、グルコースの1位のプロトンからアグリコンの7位、8位、8a位への相関が観察されたことから、糖とアグリコンとが C-C 結合していることが裏付けられた。

また、構造の確認の目的で化合物17のメタノール溶液を 1N 水酸化ナトリウムで処理して脱アセチル化し、HPLC で biflorin (6, 保持時間 23.5 分), isobiflorin (7, 保持時間 22.4 分) との直接比較を行った結果、isobiflorin と保持時間が一致した。以上の諸データより、化合物17は 6'-O-acetylisobiflorin であると決定した。

#### 4. 抽出エキスの分析

チョウジのつぼみ 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, アセトン抽出物, 水蒸気蒸留物の各 10 mg を 1 mL のメタノールに溶解させフィルター

(0.22 μm) 処理後 HPLC 分析を行い、図9(a~e) に示すクロマトグラムを得た。各抽出物について、成分精査で得た下記17種の化合物を標準試料として直接比較を行った結

果、50%エタノール抽出物、80%エタノール抽出物、水蒸気蒸留物では eugenol (1) を、エタノール抽出物及びアセトン抽出物では acetyleneugenol (2) を主構成成分として認めた。特に水蒸気蒸留物では eugenol (1) 及び acetyleneugenol (2) がほぼ全量を占めており、また ORAC 法による抗酸化能評価において最も強い活性 (29,559 μmol TE/g) を認めたことから、これらの成分が本エキスの抗酸化活性に大きく寄与していると考えられた。

- 1: eugenol
- 2: acetyleneugenol
- 3: gallic acid
- 4: ellagic acid
- 5: 3,3',4-tri-O-methylellagic acid
- 6: biflorin
- 7: isobiflorin
- 8: eugenol 4-O-(6'-O-galloyl)-β-D-glucoside
- 9: isorhamnetin 3-O-β-D-glucoside
- 10: quercetin 3-O-β-D-glucuronide 6'-O-methylester
- 11: 1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucoside
- 12: 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose
- 13: strictinin
- 14: casuarictin
- 15: tellimagrandin I
- 16: tellimagrandin II
- 17: 6'-O-acetylisobiflorin

#### D. 結論

クローブ抽出物の ORAC 法を指標とした抗酸化能評価の結果、水蒸気蒸留物に最も強い活性を認め、その主構成成分が eugenol (1) 及び acetyleneugenol (2) であることを明らかにした。また、次いで強い抗酸化活性を認めた 80%エタノール抽出物についての詳細な成分精査を行い、1種の文献未記載の化合物 [6'-O-acetylisobiflorin (17)] を含む計 17種の化合物を同定した。それらを標準試料として各

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，アセトン抽出物，水蒸気蒸留物）との直接比較を行った結果，先の抗酸化活性評価で最も強い活性を示した水蒸気蒸留物の主構成成分は eugenol (1) 及び acetyleneugenol (2) であった。また，エタノール抽出物及びアセトン抽出物では eugenol (1) を主成分として認めなかったが，このことは本試料調製過程での eugenol (1) の揮散に起因すると考えられる。そのため，過度の減圧に晒される調製条件は抗酸化剤としての本添加物の機能に影響を与える可能性が示唆される。

また，水蒸気蒸留物に次いで強い抗酸化活性を示した 80%エタノール抽出物について，*n*-ヘキサン，酢酸エチル，*n*-ブタノールで順次抽出を行い，それらについての抗酸化能を評価した結果，*n*-ヘキサン分画物（25,975  $\mu\text{mol TE/g}$ ）及び酢酸エチル分画物（9,383  $\mu\text{mol TE/g}$ ）に強い活性を認めた。それらについての成分精査から，*n*-ヘキサン分画物はほぼ全量が eugenol (1) 及び acetyleneugenol (2) から構成されており，HPLC 分析では水蒸気蒸留物とほぼ同様のクロマトグラムを示した（図 10-A）。このことも，同成分がクローブ抽出物の抗酸化活性の主要成分であることを示している。また，酢酸エチル分画物の成分精査及び HPLC 分析で得たクロマトグラム（図 10-B）ではフラボノイドをはじめ複数の加水分解性タンニンを認めたことから，クローブには eugenol (1), acetyleneugenol (2) 以外にも抗酸化活性を有する複数の成分が含まれており，それらも本抽出物の抗酸化活性に寄与していることが明らかとなった。そのため，チョウジの水蒸気蒸留残渣を再度エタノールやアセトン等で抽出することでチョウジが含む抗酸化性成分を余すことなく利用でき，資源を有効に利用することが可能であると考えられる。

## E. 参考文献

Tanaka T., Orii Y., Nonaka G., Nishioka I., Tannins and related compounds. CXXIII. Chromone, acetophenone and phenylpropanoid glycosides and their galloyl and/or hexahydroxydiphenoyl esters from leaves of *Syzygium aromaticum* MERR. et PERRY, Chem. Pharm. Bull. 41 (7), 1232-1237, 1993

Toda M., Kawabata J., Kasai T.,  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from Clove (*Syzygium aromaticum*), Biosci. Biotechnol. Biochem., 64 (2), 294-298, 2000

Ou B., Hampsch-W. M., Prior L. R., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, J. Agric. Food Chem. 49, 4619-4626, 2001

Huang D., Ou B., Hampsch-W. M., Flanagan A. J., Prior L. R., High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, J. Agric. Food Chem. 50, 4437-4444, 2002

## F. 研究業績

### 1. 論文発表

現在のところなし

### 2. 学会発表

- 1) Yoshida T., Yoshimura M., Amakura Y., Polyphenols in myrtaceous plants: Polyphenolic compounds in clove and pimento and their antioxidative activities, 7<sup>th</sup> Tannin Conference, Berlin (2010.8), [発表予定]

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

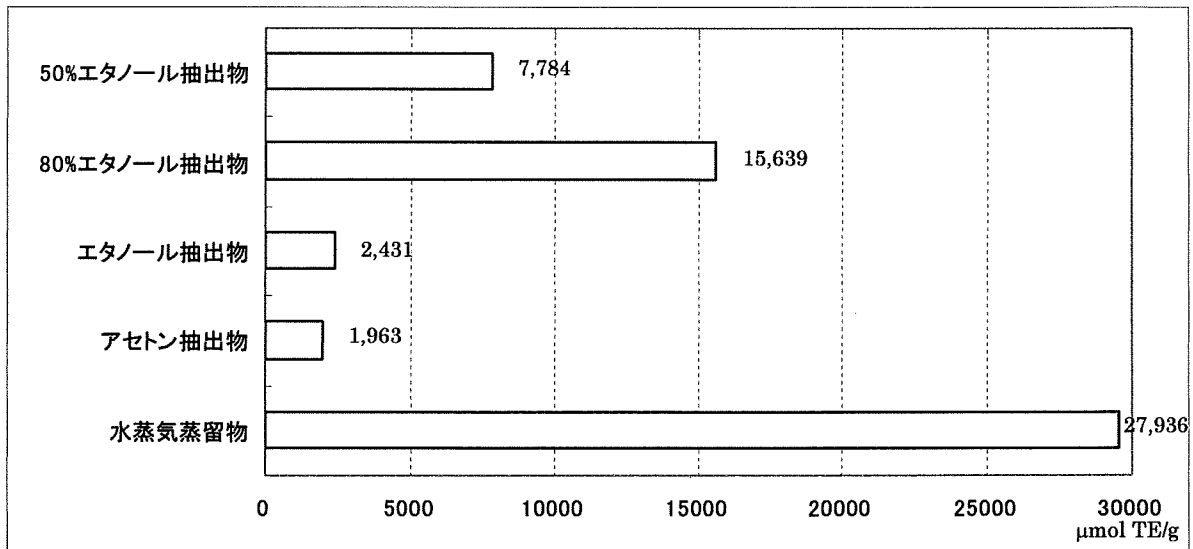


図 1. チョウジ抽出エキスの ORAC 値

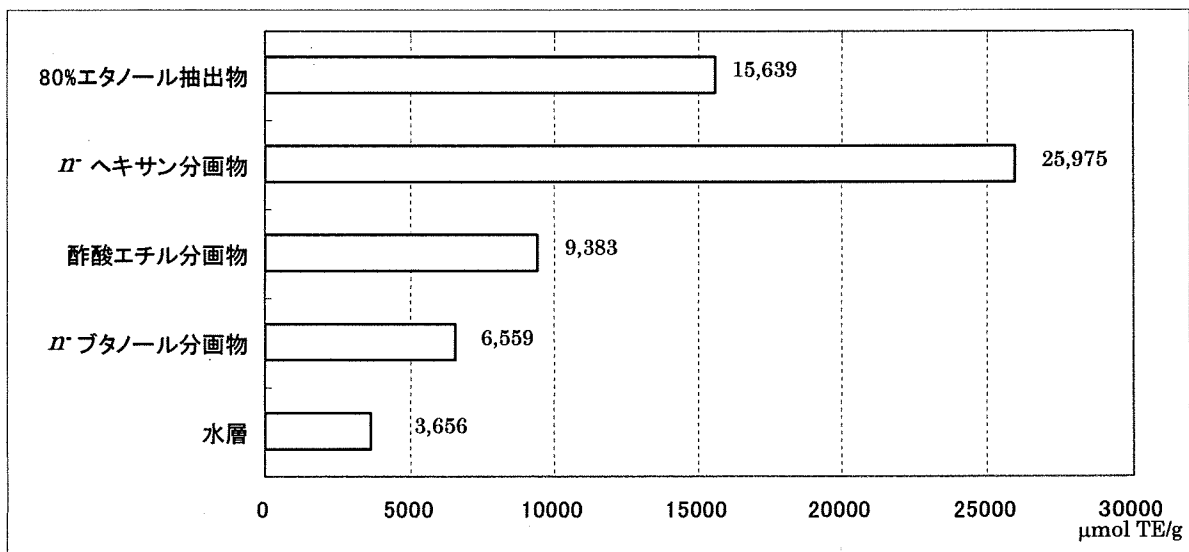


図 2. チョウジ 80%エタノール抽出エキス分画物の ORAC 値

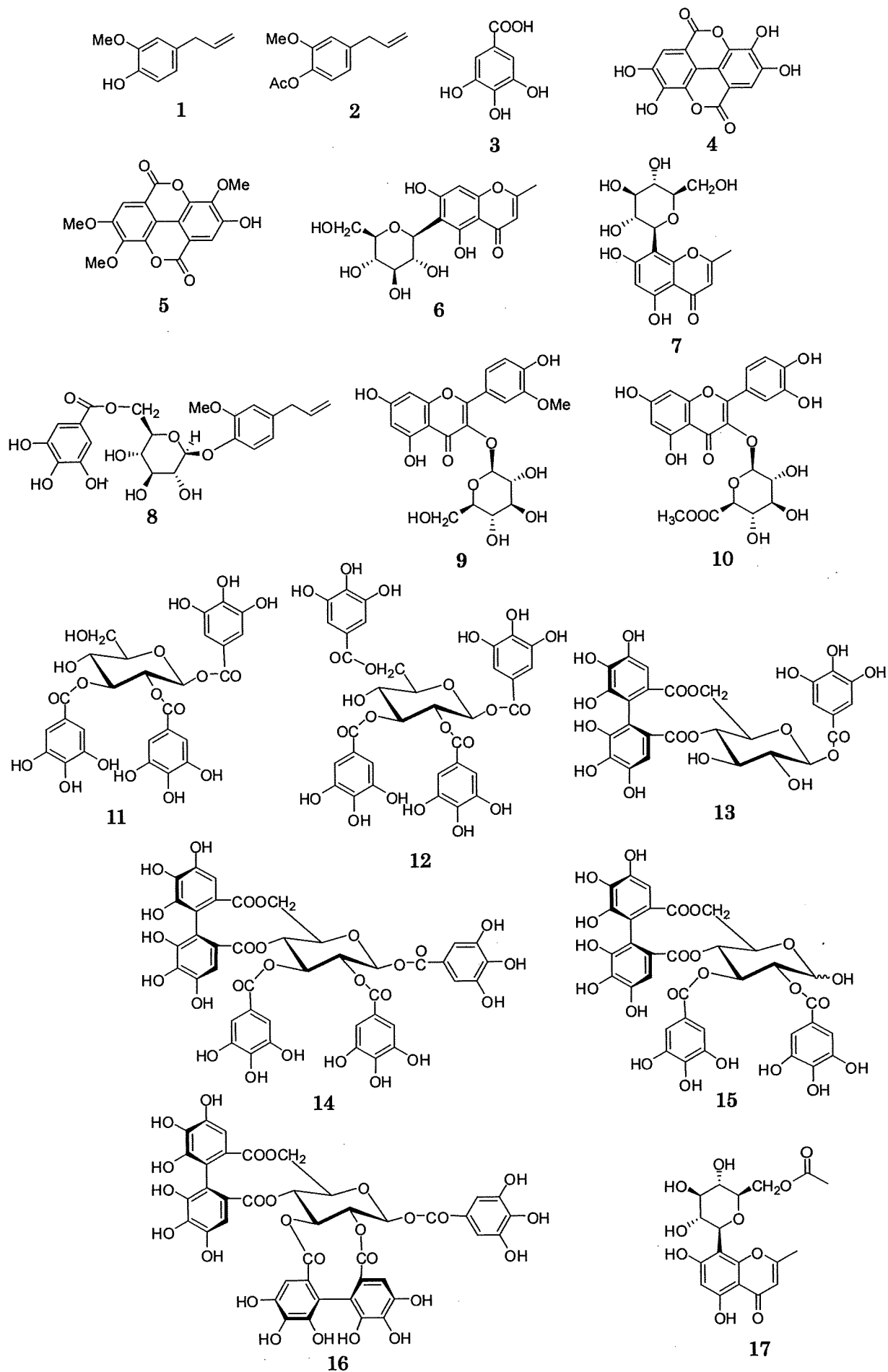
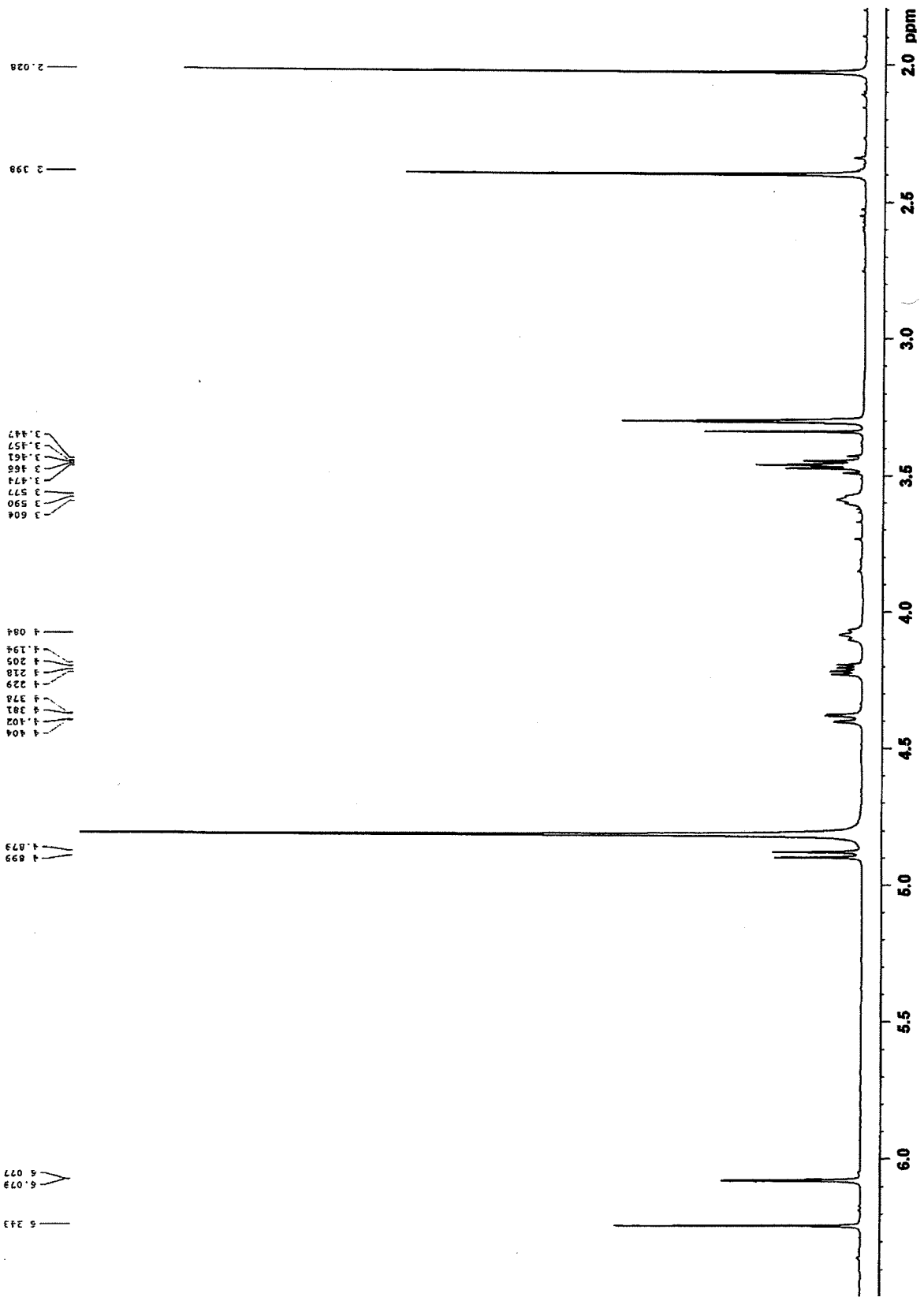


図 3. 化合物 1~17 の化学構造



4.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of 6'-O-acetylisobiflorin (17)

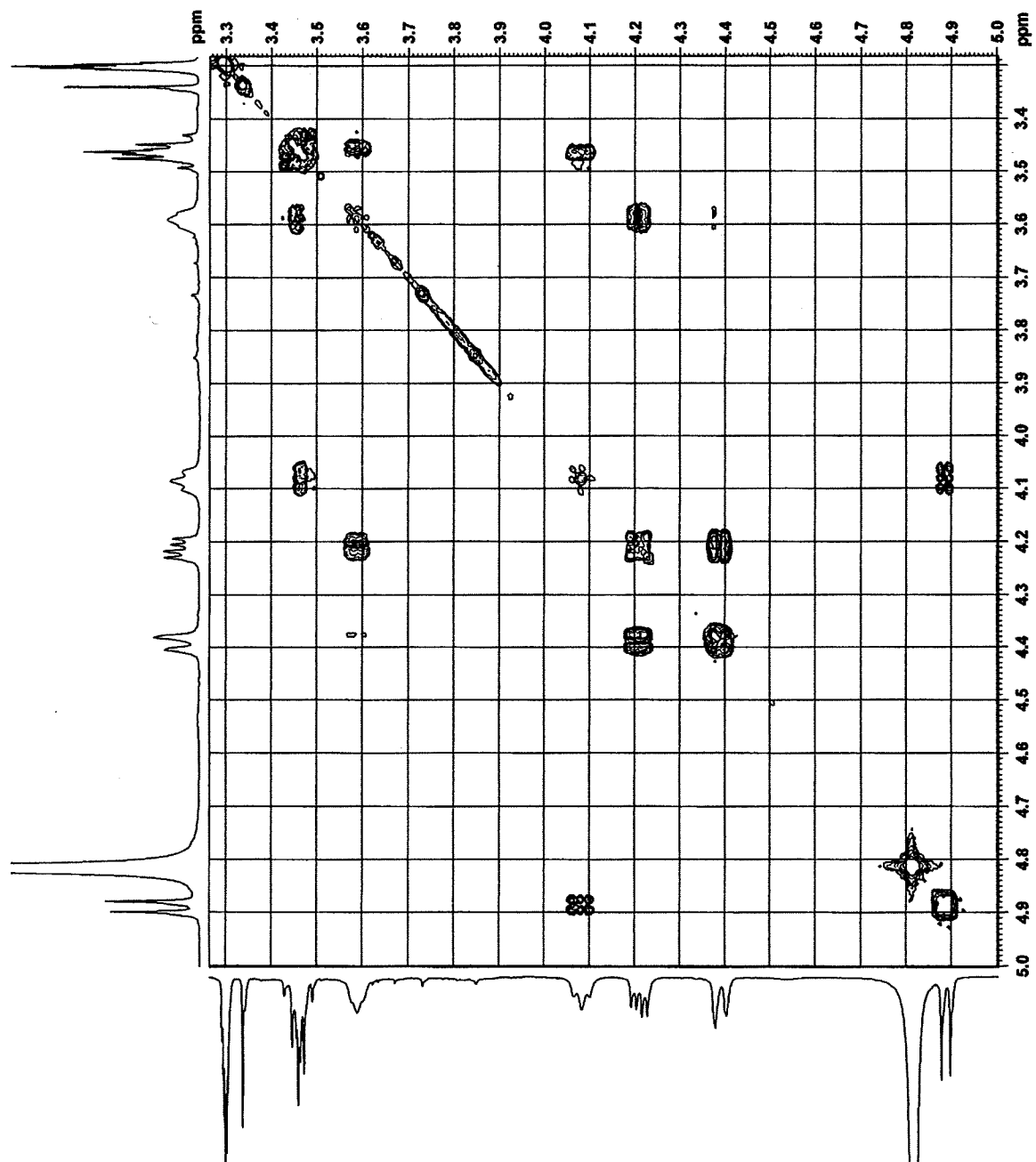
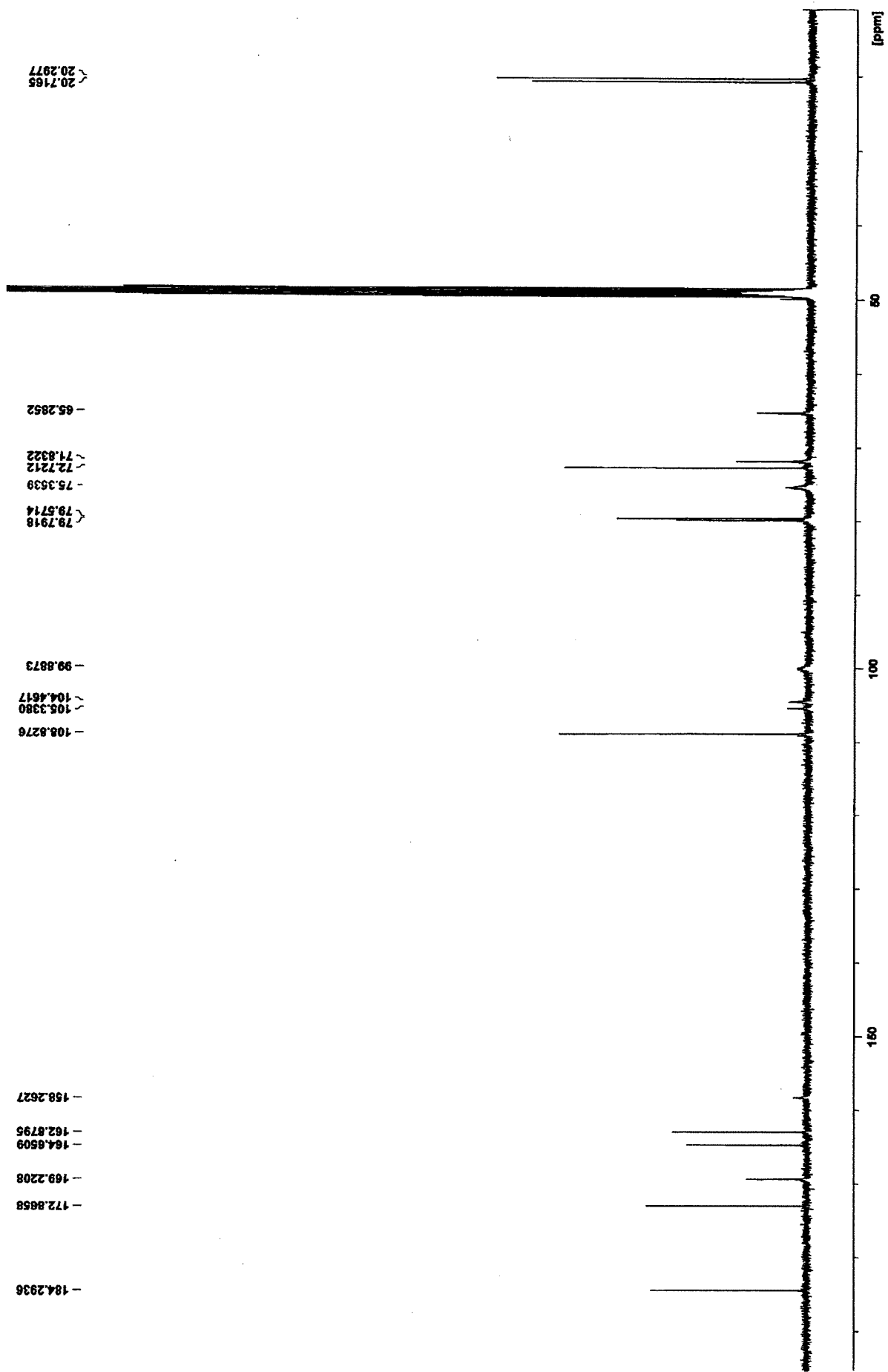


图 5. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 谱图 of 6'-O-acetylisoriflorin (17)



6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of 6'-*O*-acetylisobiflorin (17)



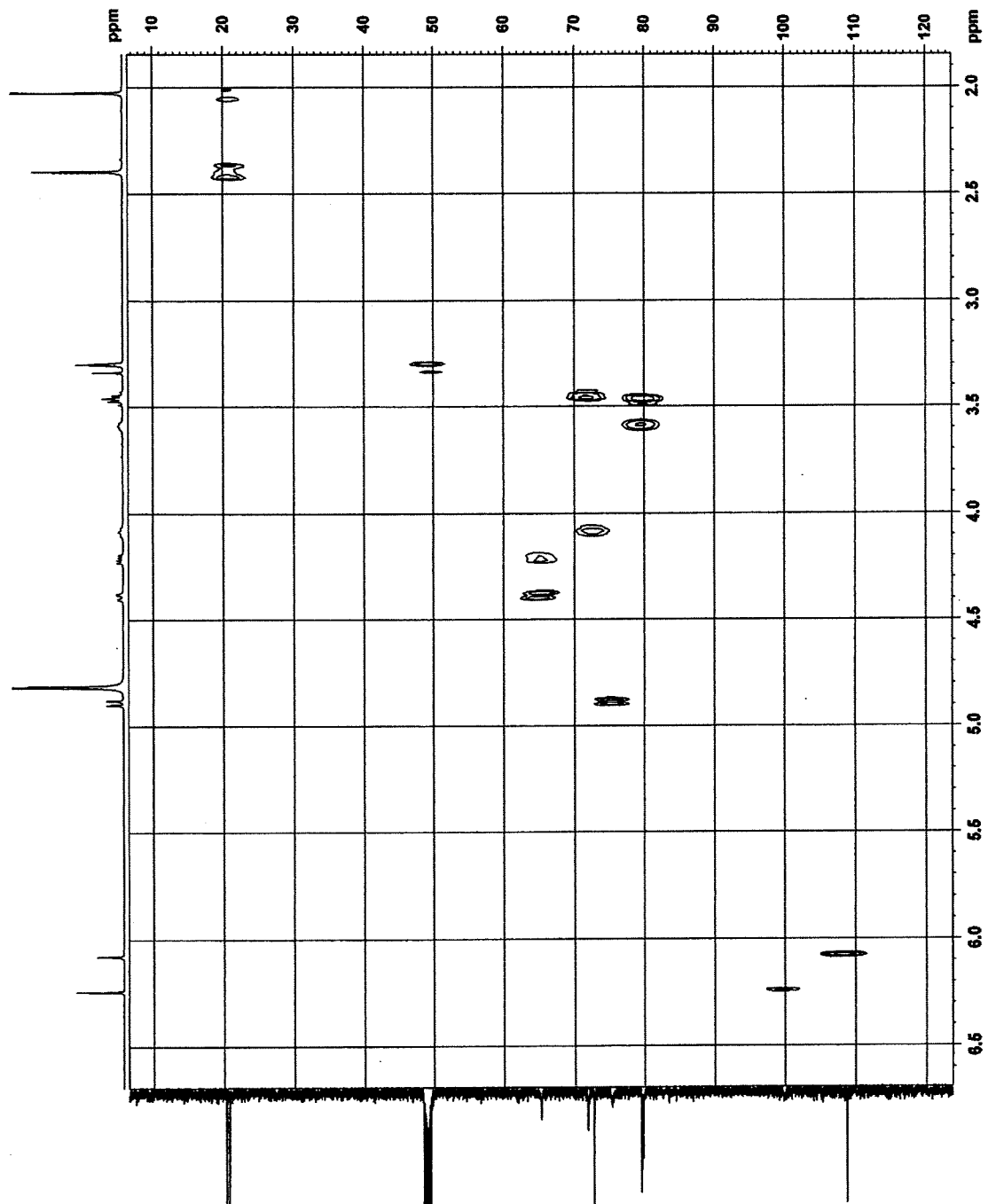


图 7. HSQC correlations of 6'-O-acetylisobiflorin (17)

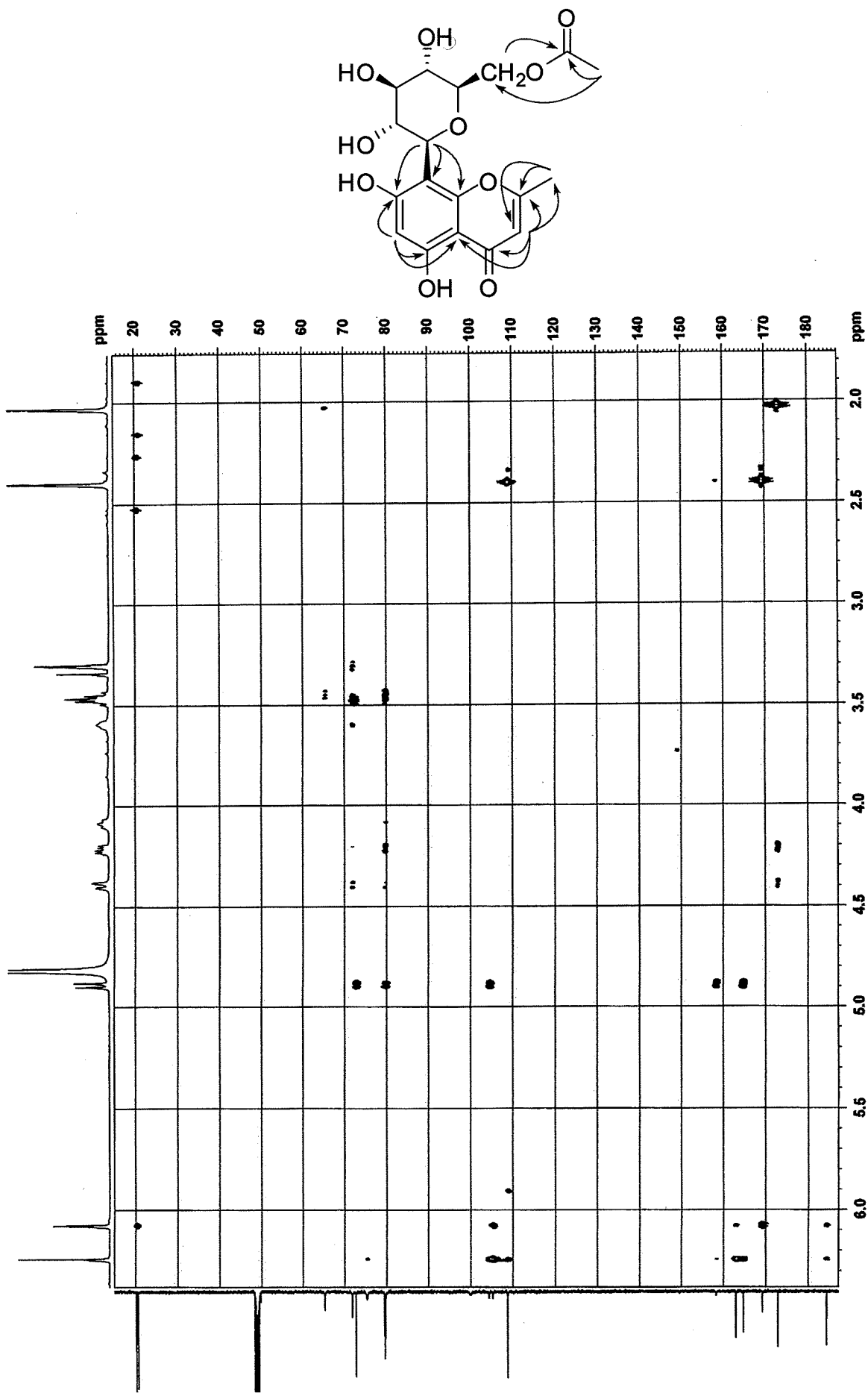


图 8. HMBC correlations of 6'-O-acetylisobiflorin (17)

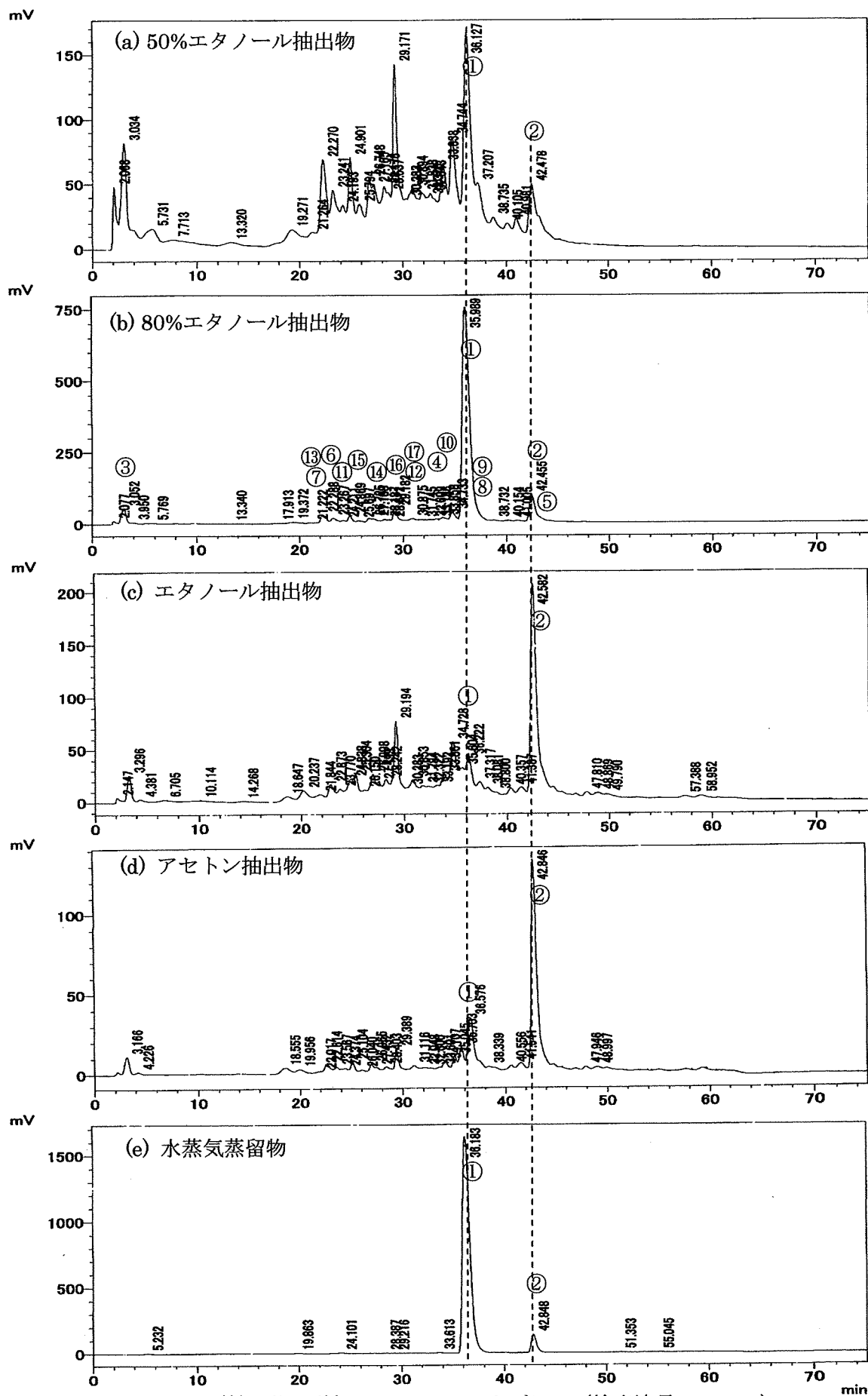


図9. クローブ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長: 280 nm)  
 (a) 50%エタノール抽出物, (b) 80%エタノール抽出物, (c) エタノール抽出物  
 (d) アセトン抽出物, (e) 水蒸気蒸留物, [クロマトグラム中の数字は化合物番号を示す]

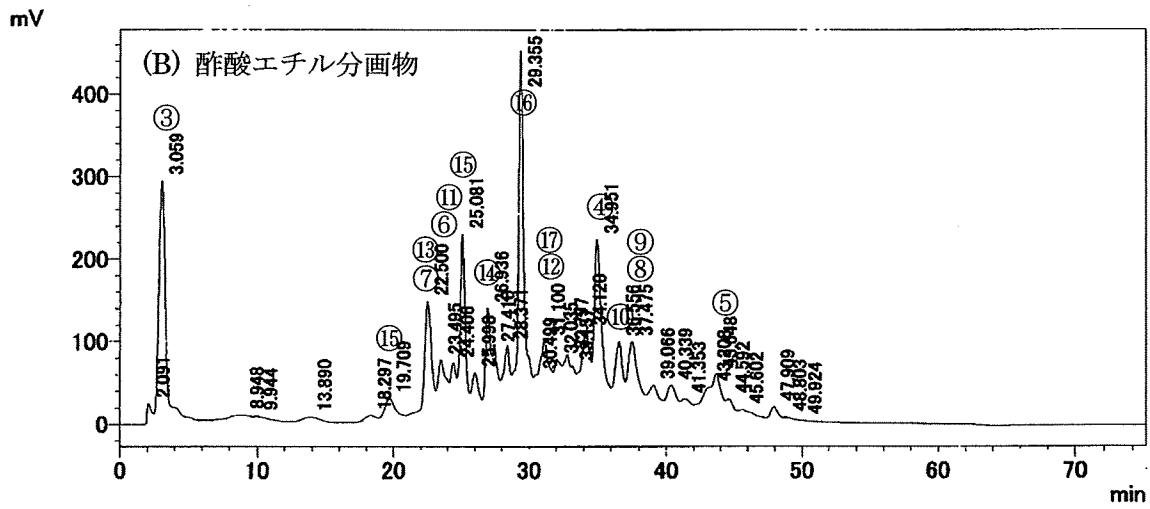
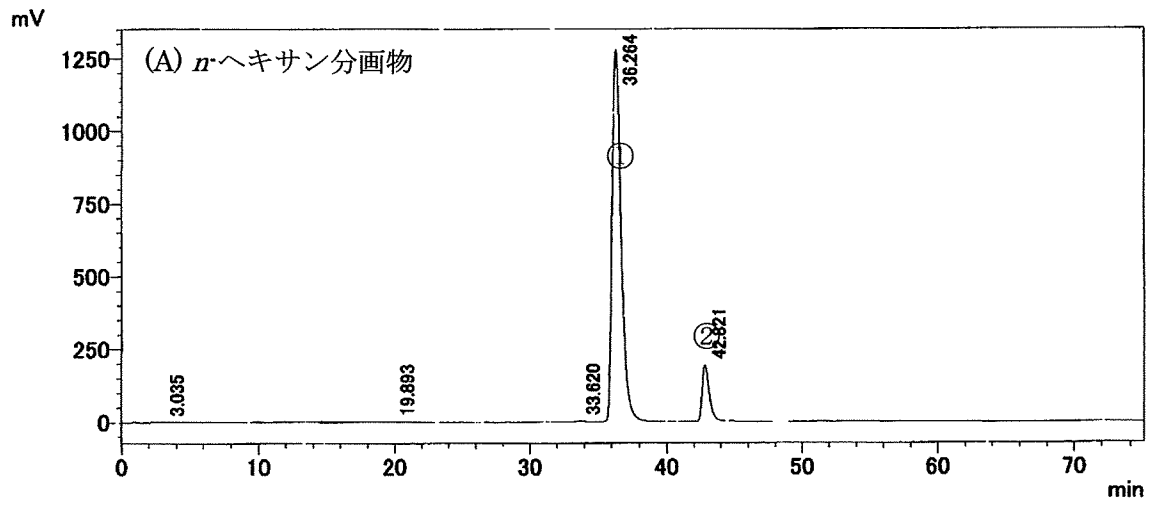


図 10. 80%エタノール分画物の HPLC クロマトグラム (検出波長: 280 nm)  
 (A) *n*-ヘキサン分画物, (B) 酢酸エチル分画物  
 [クロマトグラム中の数字は化合物番号を示す]

## II. 分担研究報告書

### 2. 天然酸化防止剤の製法による主要成分の提案

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主要成分の提案

分担研究者 吉田隆志 松山大学薬学部 教授

研究要旨

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。ドクダミにおいては、エタノールのみ抽出よりも含水エタノールとすることで抗酸化活性が高まることが認められた。また主成分および有効成分は quercitrin であり、これを指標に条件検討できることが示された。ウイキョウは、いずれの抽出物も顕著な抗酸化活性を示さなかったが、そのうち50%含水エタノールが強い活性を示し、主成分として syringin, quercetin 3-O-β-D-glucuronide が同定された。抗酸化成分については syringin の他、マイナー成分の関与も示唆されるため、それについては現在検討中である。セージについては、50%エタノール抽出物が高い抗酸化活性を示し、主成分および有効成分として rosmarinic acid が明らかとなった。ピメンタおよびクローブでは、抽出物の低極性画分（*n*-ヘキサン分画物）の抗酸化活性が顕著に強く、分画物の主成分はいずれも eugenol であった。一方で極性画分にも抗酸化活性が認められ、含有成分としてポリフェノール類が明らかとなった。それゆえ、水蒸気蒸留後の残渣抽出物の添加物としての利用も示唆された。また同じフトモモ科の原料であるユーカリは、極性画分にのみ抗酸化活性が認められた。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。

研究協力者

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

A. 研究目的

規格整備が遅れている既存添加物中の単一成分でない酸化防止剤について、複数の製法により調製した抽出物の成分分布および抗酸化活性の変動解析を行うことで、使用目的に適した製法を提案し、食品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

的とする。

B. 研究方法

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得られた知見を整理し、考察した。

### C. 研究結果および考察

ドクダミ, セージ, ウイキョウ, ピメンタ, クローブ, ユーカリ葉抽出物において, 調製した抽出物, 分画物の抗酸化活性についてデータをまとめたグラフを図1に示す. また抽出物の指標として提案される成分の化学構造式を図2に示す. 各抽出物における知見について, 以下の(1)~(6)にまとめた.

(1) ドクダミ抽出物については, 50%エタノール抽出物およびエタノール抽出物を調製し, 両者の抗酸化活性を比較した結果, 50%エタノール抽出物がほぼ2倍強い抗酸化活性を示した. さらに含有成分, 有効成分を明らかにする目的で80%エタノール抽出物を調製し, その分画物(*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水各分画物)について抗酸化活性を測定した結果, 酢酸エチル分画物の活性が顕著に強かった. その含有成分を分析したところ, quercitrinがほぼ1主ピークとして観察され, 主成分, 有効成分として示唆された. 以上の結果から, 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.

(2) セージ抽出物については, 50%エタノール, エタノール, *n*-ヘキサン, 水各抽出物を調製し, 抗酸化活性を比較したところ, 50%エタノール抽出物が高抗酸化活性を示した. 抽出物の分画物の抗酸化活性では, 酢酸エチル分画物の活性が顕著に強く, 含有成分を分析したところ, rosmarinic acidがほぼ1主ピークとして観察され, 主成分, 有効成分として支持された. 以上の結果から, 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示唆された.

(3) ウイキョウ抽出物については, 50%エタノール抽出物, エタノール抽出物および水

蒸気蒸留物, 水蒸気蒸留物除去抽出物を調製し, 抗酸化活性を比較したところ, 全体的に抗酸化能は顕著ではなかった. 供試した中では50%エタノール抽出物が抗酸化活性を示した. 抽出物の分画物の抗酸化活性は, 酢酸エチル分画物の活性が強く, 含有成分を分析したところ, 主成分である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唆された.

(4) ピメンタ抽出物については, 50%エタノール, エタノール各抽出物を調製し, 抗酸化活性を比較したところ, 50%エタノール抽出物が抗酸化活性を示した. しかし分画物の抗酸化活性は, 低極性画分である*n*-ヘキサン分画物の活性が強く, 含有成分を分析したところ, 主成分としてeugenolが検出され, 有効成分であることが示された. 今回の検討でエタノール抽出物の活性が低かったのは, 凍結乾燥によりeugenolが揮散した可能性が示唆される. 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.

(5) クローブ抽出物では, 50%エタノール, エタノール, アセトン各抽出物および水蒸気蒸留各抽出物を調製し, 抗酸化活性を比較したところ, 50%エタノール抽出物が抗酸化活性を示した. しかしピメンタの場合と同様, 分画物の抗酸化活性は, 低極性画分の*n*-ヘキサン分画物が顕著に強かった. 含有成分を分析したところ, ピメンタと同様にeugenolが主成分として検出され, これを保持した調製が有効であることが示唆された. またポリフ

エノール類の存在が示された極性画分にも抗酸化活性が認められたことから、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可能であることが示唆された。

(6) ユーカリ葉抽出物では、50%エタノール、エタノール各抽出物を調製し、抗酸化活性を比較したところ、50%エタノール抽出物が抗酸化活性を示した。抽出物の分画物の抗酸化活性は、極性画分の *n*-ブタノール分画物が強かったが、他の分画物と比較して顕著な差ではなかった。*n*-ブタノール抽出物の含有成分を分析したところ、quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronide などのフラボノイドや oenothien B などの加水分解性タンニンが検出され、これらポリフェノール類が有効成分であることが示唆された。

今回、ユーカリ葉抽出物を含む6抽出物の主成分、有効成分について考察した。試料調製における指標の一つとして、これら成分を目安に試料調製をすることで効果的な添加物供給に繋がると考察される。一方で、他のマイナー成分の寄与や相乗効果なども考慮に入れるべきである。また今回の検討の結果、天然酸化防止剤には方法により低極性化合物あるいは高極性化合物を有効成分とするものがあることが明らかとなった。それゆえ、添加する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になることが示唆された。

#### D. 結論

今回、5抽出物（ドクダミ、セージ、ウイキョウ、ピメンタ、クローブ）およびユーカリ葉抽出物の製法とそれによる抗酸化能および成分分布について検討し、ドクダミでは quercitrin、セージでは rosmarinic acid、ウイキョウでは syringin、ピメンタ、チョウジでは eugenol を指標成分とした調製法が効果的

である結果が得られた。またユーカリではポリフェノール類が抗酸化活性に寄与していることが示された。

#### E. 研究業績

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし



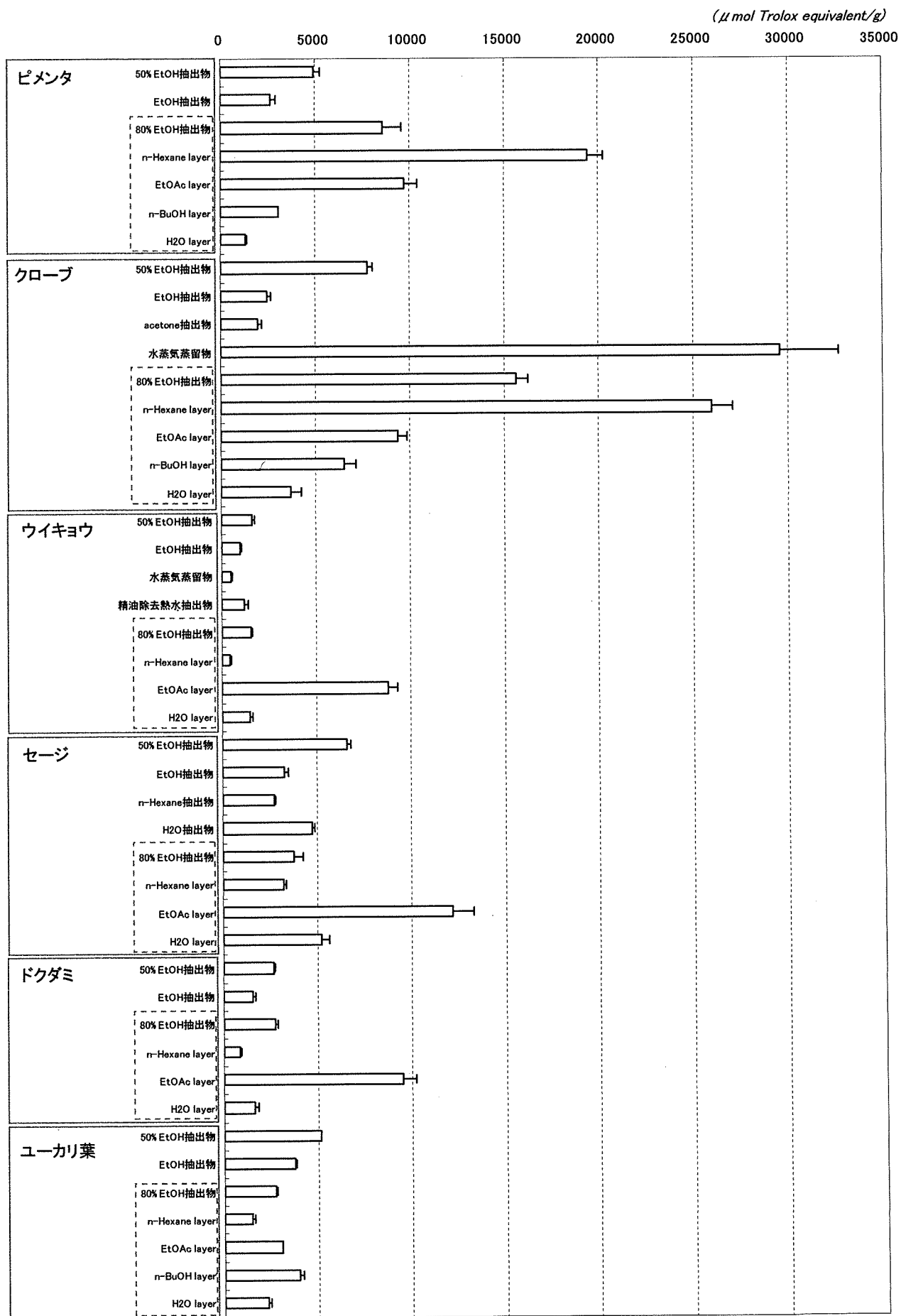
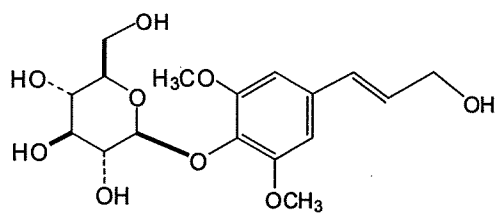
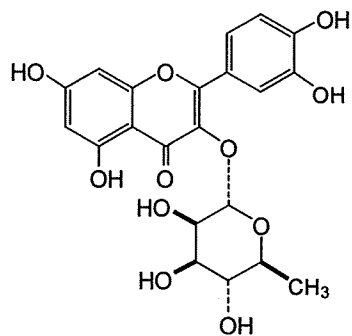


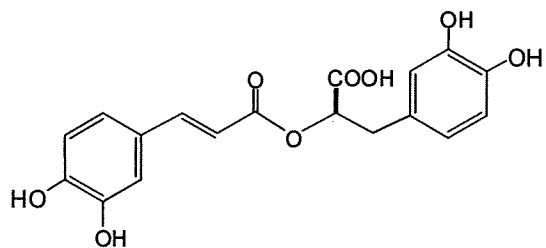
図 1. 各抽出物および分画物の抗酸化活性 (ORAC 活性)



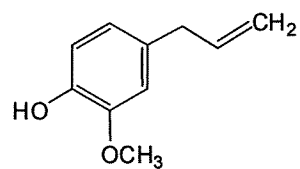
Syringin



Quercitrin



Rosmarinic acid



Eugenol

図 2. 指標となる化合物の構造

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	11	79-106	2010