

201033050A

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 22 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 …………… 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. ヒマワリ種子抽出物に関する検討 …………… 7

1-2. ローズマリー抽出物に関する検討 …………… 21

1-3. チャ抽出物に関する検討 …………… 29

1-4. 生コーヒー豆抽出物に関する検討 …………… 37

1-5. ヤマモモ抽出物に関する検討 …………… 45

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に研究を実施した。平成22年度（2年計画の2年目）は、新たに5品目（ヒマワリ種子、ローズマリー、チャ、生コーヒー豆、ヤマモモ）について検討し、酸化防止剤として有効な添加物の製法に関する新たな基礎的知見を得た。

ヒマワリ種子抽出物については、50%エタノール抽出物が強い抗酸化活性（ORAC値）を示した。さらに分画物を調製して精査した結果、主成分の chlorogenic acid および 3,5-di-O-caffeoylquinic acid が検出され、これらカフェー酸誘導体が有効成分であることが示された。

ローズマリー抽出物については、50%エタノール抽出物およびメ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、本化合物の含量を指標に調製する方法が有効であることが示された。一方で、低極性画分に分布する carnosol や carnosic acid にも抗酸化活性が認められ、これらを指標にすることで、添加する用途に応じた効果的な添加物利用が可能になることが示唆された。

チャ抽出物については、全体的に強い抗酸化能が認められたが、アルコールまたは水以外の有機溶媒（アセトン、酢酸エチル）のみによる抽出物は、他と比べ活性が弱かった。抽出物の抗酸化活性画分を分析したところ、主成分として epigallocatechin gallate（EGCG）、epicatechin gallate（ECG）および caffeine が検出された。これら化合物の抗酸化能を評価したところ、caffeine 以外は顕著な抗酸化活性を認めた。従って、EGCG、ECG を主とするカテキン類の抗酸化能への寄与が示唆された。同様に、生コーヒー豆抽出物も全体的に強い抗酸化能を示した。その中ではエタノール抽出物が最も高い抗酸化活性を示し、水抽出物の約2倍の抗酸化値を示した。抗酸化活性画分について分析した結果、主成分として chlorogenic acid、caffeine が検出された。Caffeine の抗酸化値は低いことから、本抽出物の指標成分として chlorogenic acid を主とするカフェー酸誘導体が示唆された。

ヤマモモ抽出物については、調製した全ての抽出物に強い抗酸化活性が認められた。調製した抽出物について比較すると、熱水のみによる抽出よりも含水アルコールの活性が強い傾向があった。抽出物の活性画分を分析したところ、myricitrin がほぼ1ピークで検出され、主成分、有効成分であることが示された。

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。

引き続き、22 年度はさらに 5 品目（ヒマワリ種子、チャ、ローズマリー、生コーヒー豆、ヤマモモ）について検討を実施した。

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、ヒマワリ種子、チャ、ローズマリー、生コーヒー豆、ヤマモモの 5 植物原料を試料とした。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. ヒマワリ種子抽出物に関する検討

水、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各抽出物について HPLC 分析を行ったところ、水および 50%エタノール抽出物から、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 chlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid), その他の成分として 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, caffeic acid, methyl caffeoate, methyl chlorogenate, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, eriodictyol 5-*O*-glucoside を単離、同定した。また、文献未記載の化合物 [benzylalcohol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-(4-*O*-caffeoyl) glucopyranoside] を単離、構造決定し、新たな成分情報を加えることができた。

製法による成分比較をすると、水および 50%エタノール抽出物において、主ピークと

して chlorogenic acid が検出された。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最も強かった。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 chlorogenic acid および 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid 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. ローズマリー抽出物に関する検討

エタノール、50%エタノール、メタノール、50%メタノール、水、ヘキサン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、各抽出物について HPLC 分析を行ったところ、水およびヘキサン抽出物を除く抽出物に 1 本の主ピークが観察された。この主検出成分を単離し、構造解析したところ、rosmarinic acid と同定された。またその他の検出した成分として、carnosol を同定した。

各抽出物について抗酸化活性 (ORAC 活性) を評価したところ、50%の含水エタノールおよびメタノールの抗酸化活性が強く、ヘキサン抽出物の抗酸化活性が最も弱かった。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、抗酸化活性を評価した。その結果、酢酸エチル分画物に顕著な抗酸化活性が認められた。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 rosmarinic acid がほぼ 1 ピークで検出された。そこで rosmarinic acid について抗酸化活性を評価したところ、茶カテキン epigallocatechin gallate (EGCG) の 2 倍以上の顕著な ORAC 値を示し、有効 (指標) 成

分であることが示唆された。

1-3. チャ抽出物に関する検討

水、熱湯、50%エタノール、エタノール、メタノール、アセトン、酢酸エチ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、各抽出物について HPLC 分析を行ったところ、全抽出物において3本の主ピークが観察され、標品との直接比較により、epigallocatechin gallate (EGCG), caffeine, epicatechin gallate (ECG) と同定した。その他の成分として、epigallocatechin (EGC), catechin, epicatechin, gallocatechin gallate (GCG), epicatechin gallate (ECG), catechin gallate (CG) がマイナーピークとして検出された。

各抽出物について抗酸化活性を評価したところ、全体的に抗酸化能は強かったが、アルコールまたは水以外の有機溶媒（アセトン、酢酸エチル）のみによる抽出物の抗酸化活性は弱い傾向が認められた。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、抗酸化活性を評価した。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 EGCG, ECG, caffeine が検出された。これら3化合物について抗酸化活性を評価したところ、caffeine の ORAC 値は低く、EGCG および ECG とともに高い ORAC 値を示した。従って、チャ抽出物の有効（指標）成分として、EGCG および ECG が示唆された。

1-4. 生コーヒー豆抽出物に関する検討

水、50%エタノール、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、各抽出物について HPLC 分析を行った

ところ、全抽出物において2本の主ピークが観察され、標品との直接比較により、chlorogenic acid, caffeine と同定した。その他の成分として、カフェー酸誘導体（4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid）が同定された。各抽出物について抗酸化活性を評価したところ、全体的に抗酸化能が認められ、エタノール抽出が最も強く、次いで50%エタノール抽出物、水抽出物の順であった。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、抗酸化活性を評価した。その結果、水分画物が最も強く、次いで酢酸エチル分画物が抗酸化活性を示した。一方、*n*-ヘキサン分画物はほとんど活性を示さなかった。水分画物の HPLC 分析を行ったところ、主成分の chlorogenic acid, caffeine およびカフェー酸誘導体が検出された。Caffeine の ORAC 値は低いことから、コーヒー豆抽出物の有効（指標）成分として、chlorogenic acid を主としたカフェー酸誘導体が示唆された。

1-5. ヤマモモ抽出物に関する検討

熱水、含水エタノール（50%, 80%）、エタノールまたはメタノールを用いた抽出エキスを調製し、それらの抗酸化能を ORAC 法で評価した。その結果、80%エタノール抽出物に最も強い活性を認めたため、抗酸化活性を指標とした詳細な成分精査を行い、3種の文献未記載の化合物 [myricanone 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside, myricanol 11-*O*-sulfate, juglanin B 11-*O*-sulfate] を含む14種の化合物 [myricitrin, myricanol, myricanone, gallic acid, myricetin, prodelphinidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate, epigallocatechin 3-*O*-gallate, actinidione, myricetin 3-*O*-(2"-*O*-galloyl)- rhamnoside, (*R*)-, (*S*)-myricanol 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside] を

単離し、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（熱水抽出物、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、メタノール抽出物）との直接比較から、各抽出エキスの主要成分は myricitrin であり、この成分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。また、80%エタノール抽出物の分画物のうち、その過程で形成された沈殿物および酢酸エチル分画物に強い抗酸化活性が認められ、成分分析から、沈殿物では myricitrin、酢酸エチル分画物では myricitrin, myricanol, epigallocatechin 3-O-gallate およびその 2 量体を主構成成分として認めた。このことから、これらの活性がヤマモモ抽出物の強い抗酸化活性に寄与していると考えられる。

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（ヒマワリ種子、ローズマリー、チャ、生コーヒー豆、ヤマモモ）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。

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、ヒマワリ種子、ローズマリー、チャ、生コーヒー豆、ヤマモモ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。ヒマワリ種子抽出物については、chlorogenic acid および 3,5-di-O-caffeoylquinic acid 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。ローズマリー抽出物については、rosmarinic acid 含量を目安に水や含水エタノール

で調製する方法が有効であることが明らかとなった。一方で、低極性画分に分布する carnosol や carnosic acid にも抗酸化活性が認められ、これらを指標にすることで、添加する用途に応じた効果的な添加物利用が可能になることが示唆された。チャ抽出物については、アセトンや酢酸エチルといった有機溶媒のみでの抽出よりも、水、アルコールまたは含水アルコールで抽出したものの方が高い抗酸化能を示した。検出されたカテキン類の中で、特に EGCG, ECG は顕著な分布と抗酸化活性を示し、これらが抗酸化能に寄与していることが示唆された。ヤマモモ抽出物については、いずれの製法において高い抗酸化活性を示したが、熱水のみよりも含水アルコールまたはアルコールにより抽出した方が、抗酸化能が高かった。主成分として myricitrin がほぼ 1 ピークで検出され、本抽出物の強い抗酸化活性はそれに起因するものと推察された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amakura Y., Yoshimura M., Yoshimura A., Yoshida T., Variational analysis of marker constituents and antioxidative potencies by preparation methods of natural antioxidants as food additives. Jpn. J. Food Chem. Safety 18: (2011).
- 2) Yoshida T., Yoshimura M., Amakura Y., Polyphenols in myrtaceous plants: Polyphenolic compounds in clove and pimento and their antioxidative activities. Planta Med. 76: 1377 (2010).

2. 学会発表

- 1) 天倉吉章, 好村守生, 大内かずさ, 吉田

隆志, ヒマワリ種子に含まれるポリフェノール成分. 日本薬学会第 131 年会 (2011. 3).

- 2) 好村守生, 天倉吉章, 吉田隆志: ヤマモモ (*Myrica rubra*) の抗酸化性成分. 日本薬学会第 131 年会 (2011. 3).
- 3) 好村守生, 天倉吉章, 吉田隆志, 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. 日本生薬学会第 57 回年会 (2010. 9).

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

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

ヒマワリ種子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「ヒマワリ種子抽出物」の製法による成分分布を精査する目的で、水、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各抽出物について HPLC 分析を行ったところ、水および 50%エタノール抽出物から、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 chlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid)、その他の成分として 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid、caffeic acid、methyl caffeate、methyl chlorogenate、4-*O*-caffeoylquinic acid、5-*O*-caffeoylquinic acid、eriodictyol 5-*O*-glucoside を単離、同定した。また、文献未記載の化合物〔benzylalcohol β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-(4-*O*-caffeoyl)glucopyranoside〕を単離、構造決定し、新たな成分情報を加えることができた。

製法による成分比較をすると、水および 50%エタノール抽出物において、主ピークとして chlorogenic acid が検出された。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 chlorogenic acid および 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid 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

と呼ばれ、食用の他、食用油の原料にされる。種子にはリノール酸が豊富に含まれており、動脈硬化を予防する働きがあるとされる。ヒマワリ種子の含有成分については、脂肪油に関する報告が多数ある。一方で、カフェー酸誘導体を中心としたポリフェノール成分に関する報告も数報ある。

A. 研究目的

ヒマワリ [*Helianthus annuus* L. (キク科)] は、北アメリカ原産の一年草で、観賞用としても日本各地で栽培されている。日干しした種子は向日葵子(こうじつきし、ひまわりし)

このヒマワリ種子を原料とする食品添加

物ヒマワリ種子抽出物は、既存添加物名簿品目リストに記載され、用途は酸化防止剤で、基原・製法・本質は「キク科ヒマワリ (*Helianthus annuus* Linne)の種子又は種子の搾油相より、熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸である」と記載されている。添加物ヒマワリ種子抽出物については、成分研究に関する報告はこれまで見当たらない。

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、ヒマワリ種子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

ヒマワリ種子〔サンフラワーシード(殻を除いたもの)〕は長岡香料株式会社より供与いただいたものを用いた。分離、精製に使用したカラム充填剤は、Sephadex LH-20 (GE Healthcare), MCI GEL CHP20P (75–150 μ m) (三菱化学) および 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。Chlorogenic acid および caffeic acid の標品は東京化成製を用いた。

2. 装置及び測定条件

NMR : Brucker 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 methanol- d_4 (CD_3OD) 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) アセトニトリル [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

ヒマワリ種子を粉碎し、その 2 g を水、50% エタノール [エタノール-水 (1:1)] またはエタノール (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 (水抽出物、50%エタノール抽出物、エタノール抽出物) とした。

分離、精製用の試料は、ヒマワリ種子 (800 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)] (6 L) で抽出後、*n*-ヘキサン (2 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 [*n*-ヘキサン分画物 (41.6 g), 酢酸エチル分画物 (1.0 g), 水分画物 (45.1 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 (Sephadex LH-20, MCI-gel CHP20P および

YMC GEL ODS-AQ) による分離精製を繰り返して、5-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid) (1) (2.0 mg), caffeic acid (2) (2.6 mg), chlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid) (3) (130 mg), 4-*O*-caffeoylquinic acid (4) (2.5 mg), methyl chlorogenate (5) (2.5 mg), eriodictyol 5-*O*- β -D-glucoside (6) (3.6 mg), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7) (20.5 mg), methyl caffeate (8) (2.3 mg) を単離、同定した。また文献未記載の benzylalcohol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-(4-*O*-caffeoyl) glucopyranoside (9) (3.6 mg) を単離、構造決定した。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

ヒマワリ種子の水、50%エタノールおよび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~c) 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、ヒマワリ種子の 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 (d~g) 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。これら検出された成分を明らかにするために、各種カラムクロマトによる分離、精製を繰り返して、計 9 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、または標品との直接比較により以下のように同定、構造決定した (化合物 1-9)。

- 1: 5-*O*-caffeoylquinic acid
- 2: caffeic acid
- 3: chlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid)
- 4: 4-*O*-caffeoylquinic acid
- 5: methyl chlorogenate
- 6: eriodictyol 5-*O*- β -D-glucoside
- 7: 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid
- 8: methyl caffeate
- 9: benzylalcohol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-(4-*O*-caffeoyl) glucopyranoside

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。このうち、化合物 9 は文献未記載の化合物であり、その構造決定については次項に記す。これらを標品とし、含有成分について検討した。

5-*O*-Caffeoylquinic acid (Neochlorogenic acid)

(1): ¹H-NMR (CD₃OD) 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). ¹³C-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 [M-H].

Caffeic acid (2) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.57 (1H, d, $J=15.5$, H-7'), 7.07 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.96 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6'), 6.80 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.30 (1H, d, $J=15.5$, H-8'). ESI-MS m/z 179 [M-H].

3-O-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid) (3) : $^1\text{H-NMR}$ (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 [M-H].

4-O-Caffeoylquinic acid (Cryptochlorogenic acid) (4) : $^1\text{H-NMR}$ (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 [M-H].

Methyl chlorogenate (5) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.52 (1H, d, $J=16$, H-7'), 7.03 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.94 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6'), 6.77 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.19 (1H, d, $J=16$, H-8'), 5.26 (1H, m, H-3), 4.12 (1H, m, H-5), 3.71 (1H, m, H-4), 3.69 (3H, s, -OMe), 1.90-2.22 (4H, m, H-2, 6). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 175.4 (C-7), 168.3 (C-9), 149.7 (C-4'), 147.2 (C-7'), 146.9 (C-3'), 127.7 (C-1'), 123.0 (C-6'), 116.5 (C-5'), 115.14 (C-8'), 115.08 (C-2'), 75.8 (C-1), 72.5 (C-4), 72.1 (C-3), 70.4 (C-5), 53.0 (-OMe), 38.1, 37.9 (C-2, 6). ESI-MS m/z 367 [M-H].

Eriodictyoyl 5-O- β -D-glucoside (6) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 6.91 (1H, d, $J=1.5$, H-2'), 6.79 (1H, dd, $J=1.5$, 8, H-6'), 6.78 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.20 (1H, d, $J=1.5$, H-8), 6.18 (1H, d, $J=1.5$, H-6), 5.33, 5.31 (1H in total, m, H-2), 4.97, 4.96 (1H in total, d, $J=7.5$, glc H-1), 3.87, 3.68 (each 1H, m, glc H-6), 3.35-3.48 (4H, glc H-2-5), 3.13, 3.10 (each 1H, d, $J=13$, H-3), 2.76, 2.73 (1H in total, m, H-2). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 198.5 (C-4), 167.0 (C-8), 165.0 (C-5), 164.6 (C-9), 147.0 (C-4), 146.6 (C-3), 131.6 (C-1'), 119.3 (C-6'), 116.3 (C-5'), 114.8 (C-2'), 105.0 (C-10), 98.0 (C-6), 96.9 (C-8), 80.8, 80.7 (1C in total, C-2), 44.2, 44.1 (1C in total, C-3), 101.2 (glc C-1), 78.3, 77.3, 74.7, 71.9 (glc C-5), 62.3 (glc C-6). ESI-MS m/z 449 [M-H].

3,5-Di-O-caffeoylquinic acid (7) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.61 (1H, d, $J=16$), 7.57 (1H, d, $J=16$) (H-7', 7''), 7.06 (2H, brs, H-2', 2''), 6.95 (2H, m, H-6', 6''), 6.77 (2H, d, $J=8$, H-5', 5''), 6.35 (1H, d, $J=16$), 6.25 (1H, d, $J=16$) (H-8', 8''), 5.40 (2H, m, H-3, 5), 3.97 (1H, m, H-4), 2.13-2.34 (4H, m, H-2, 6). ESI-MS m/z 515 [M-H].

Methyl caffeoate (8) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.54 (1H, d, $J=16$, H-7'), 7.02 (1H, d, $J=2$, H-2'), 6.93 (1H, dd, $J=2$, 8, H-6'), 6.76 (1H, d, $J=8$, H-5'), 6.24 (1H, d, $J=16$, H-8'), 3.75 (3H, s, -OMe). ESI-MS m/z 193 [M-H].

Benzylalcohol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-(4-O-caffeoyl) glucopyranoside (9) : $[\alpha]_D^{25}$ -54° ($c=0.5$, CH_3OH). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.68 (1H, d, $J=16$, caffeoyl H-7), 7.43-7.25 (5H, m, benzyl H-2-6), 7.05 (1H, d, $J=2$, caffeoyl H-2), 6.95 (1H, dd, $J=2$, 8.5, caffeoyl H-6), 6.77 (1H, d, $J=8.5$, caffeoyl H-5), 6.28 (1H, d, $J=16$, caffeoyl H-8), 4.91, 4.68 (each 1H, d, $J=12$,

benzyl H-7), 4.40 (1H, d, $J=8$, glc H-1), 3.35 (1H, dd, $J=8, 9.5$, glc H-2), 3.60 (1H, t, $J=9.5$, glc H-3), 4.87 (1H, t, $J=9.5$, glc H-4), 3.66 (1H, m, glc H-5), 3.73 (1H, dd, $J=2.5, 11$), 3.53 (1H, dd, $J=6.5, 11$) [glc H-6], 4.95 (1H, d, $J=2$, api H-1), 3.89 (1H, d, $J=2$, api H-2), 3.56 (2H, s, api H-4), 3.94 (1H, d, $J=9.5$), 3.74 (1H, d, $J=9.5$) [api H-5]. $^{13}\text{C-NMR}$ δ 168.4 (caffeoyl C-9), 149.8 (caffeoyl C-4), 147.6 (caffeoyl C-7), 146.8 (caffeoyl C-3), 138.9 (benzyl C-1), 128.8 (benzyl C-4), 129.3 (4C, benzyl C-2,3,5,6), 127.7 (caffeoyl C-1), 123.1 (caffeoyl C-6), 116.5 (caffeoyl C-5), 115.2 (caffeoyl C-2), 114.8 (caffeoyl C-8), 71.9 (benzyl C-7), 103.2 (glc C-1), 75.3 (glc C-2), 75.8 (glc C-3), 72.8 (glc C-4), 74.9 (glc C-5), 68.6 (glc C-6), 111.1 (api C-1), 78.1 (api C-2), 80.6 (api C-3), 65.7 (api C-4), 75.1 (api C-5). HR-ESI-MS m/z 563.1741 [M-H]⁻ (Calcd for C₃₄H₂₈O₂₂-H, 563.1770).

2. 化合物 9 の構造決定

化合物 9 は文献未収載の化合物であった。以下にその構造決定について記す。本化合物は淡褐色無晶形粉末として得られ、HR-ESI-MS の結果から、分子量 C₃₄H₂₈O₂₂ であることが支持された。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (図 3a) において、芳香族プロトン領域に caffeoyl 基に由来する *trans* 位のオレフィンプロトンおよび ABX タイプのシグナルがそれぞれ 1 組観察され、その他 benzyl 基に由来する 5H 分のシグナルが 1 組のメチレンプロトンとともに観察された。脂肪族領域のシグナルを見ると、糖の存在が認められ、 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY (図 3c) のつながりとそれぞれのピークのカップリング定数から、グルコースとアピオースの存在が示唆された。これらの存在は、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルおよび HSQC スペクトルの結果からも矛盾なく支持された (図 3b, d)。よって、本化合物はグルコース、アピオース、benzyl 基、caffeoyl 基により構成

される構造であることが推測された。各部分構造のつながりを明らかにするために、HMBC スペクトルを測定した。その結果、グルコースの 1 位のプロトンと benzyl 基のメチレンプロトン、アピオースの 1 位のプロトンとグルコース 6 位のカーボン、グルコース 4 位のプロトンと caffeoyl 基のカルボニル基カーボンに、それぞれ相関が観察され (図 3e)、各部分構造のつながりを明らかにすることができた。また構成糖については、酸加水分解後、L-cysteine methyl ester および *o*-tolyl isothiocyanate を反応させて誘導体化することで、D 体のグルコースおよびアピオースをそれぞれ確認することができた。以上の結果に基づき、化合物 9 の構造を benzylalcohol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-4-*O*-caffeoyl glucopyranoside と構造決定した。

3. 調製した抽出物の成分分布

ヒマワリ種子の水、50%エタノールおよびエタノール抽出物の HPLC クロマトグラム [図 1 (a~c)] を比較したところ、水、50%エタノール抽出物において保持時間 10 分付近に主要ピークが検出された。このピークを単離、解析したところ、chlorogenic acid (3) と同定された。また、その他のカフェー酸誘導体 [5-*O*-caffeoyl quinic acid (1), caffeic acid (2), 4-*O*-caffeoyl quinic acid (4), methyl chlorogenate (5), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7), methyl caffeate (8)] 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、全体的に 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 (d~g)]。その結果、主要成分である 3 のピークは水および酢酸エチル分画物に認められた。酢酸エチル分画物は 3 の他、7 が主ピークとして検出された。一方、ヘキサン分画にはいずれもほとんどピークも検出さ

れなかった。

4. 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（水、50%エタノールおよびエタノール抽出物）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 4 に示す。ORAC 測定の結果、50%エタノール抽出物が最も抗酸化能が強く、次いで水抽出物であったが、50%エタノール抽出物の 1/2 弱の活性であった。一方、エタノール抽出物は最も弱い結果となった。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 chlorogenic acid (3) および 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7) が有効（指標）成分である可能性が示唆された [図 1 (f)]。

D. 考察

分画物の抗酸化活性においては、酢酸エチル分画物が顕著に強かった。その含有成分をみると、2つの主ピークが検出され、エキス全体の主成分である chlorogenic acid (3) とともに 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7) (別名 イソクロロゲン酸) が同定された。既存添加物名簿には、本添加物について「有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸である」と記載されており、本検討においてもこれを支持する結果が得られた。抗酸化活性については、水のみで抽出するよりも 50%エタノール抽出物の方が約 2 倍強い結果となった。既存添加物名簿には、「熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである」とあり、水のみで抽出するよりも、含水アルコールで抽出することで、より効果的な酸化防止剤を調製できるのではないかと考察される。また

マイナーピークとして、その他のカフェー酸誘導体の分布も認められており、それゆえ、本抗酸化活性には、3 を主とするカフェー酸誘導体が寄与していることが示唆される。

以上の結果から、ヒマワリ種子抽出物を調製する場合、含水エタノールの方が高い抗酸化能であることが示唆され、指標成分として 3 を主成分として抽出効率をよくすることで、抗酸化能の向上がはかれることが考察された。

E. 結論

酸化防止剤ヒマワリ種子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、ヒマワリ種子の水、50%エタノール抽出物およびエタノール抽出物を調製し、比較検討した結果、主成分として chlorogenic acid (3) 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 3 と 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7) のピークが主ピークとして検出された。それゆえ、これらカフェー酸誘導体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。また文献未記載の化合物 benzylalcohol β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-(4-*O*-caffeoyl) glucopyranoside を単離、構造決定し、新たな成分情報を加えることができた。

F. 参考文献

- 1) 奥田拓男編「天然薬物事典」, 廣川書店, 東京, 1981.
- 2) Weisz GM., Kammerer DR., Carle R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by

HPLC-DAD/ESI-MSⁿ, Food Chemistry 2009:
115, 758-765.

- 3) Pedrosa MM., Muzquiz M., García-Vallejo, C., Burbano, C., Cuadrado C., Ayet G., Robredo LM. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds, J. Sci. Food Agric. 2000: 80, 459-464.
- 4) Etievant PX., Azar M., Pham-Delegue MH., Masson CJ. Isolation and identification of volatile constituents of sunflowers (*Helianthus annuus* L.), J. Agric. Food Chem. 1984: 32, 503-509.

F. 研究業績

論文発表

現在のところなし

学会発表

天倉吉章, 好村守生, 大内かずさ, 吉田隆志, ヒマワリ種子に含まれるポリフェノール成分. 日本薬学会第 131 年会 (2011. 3).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

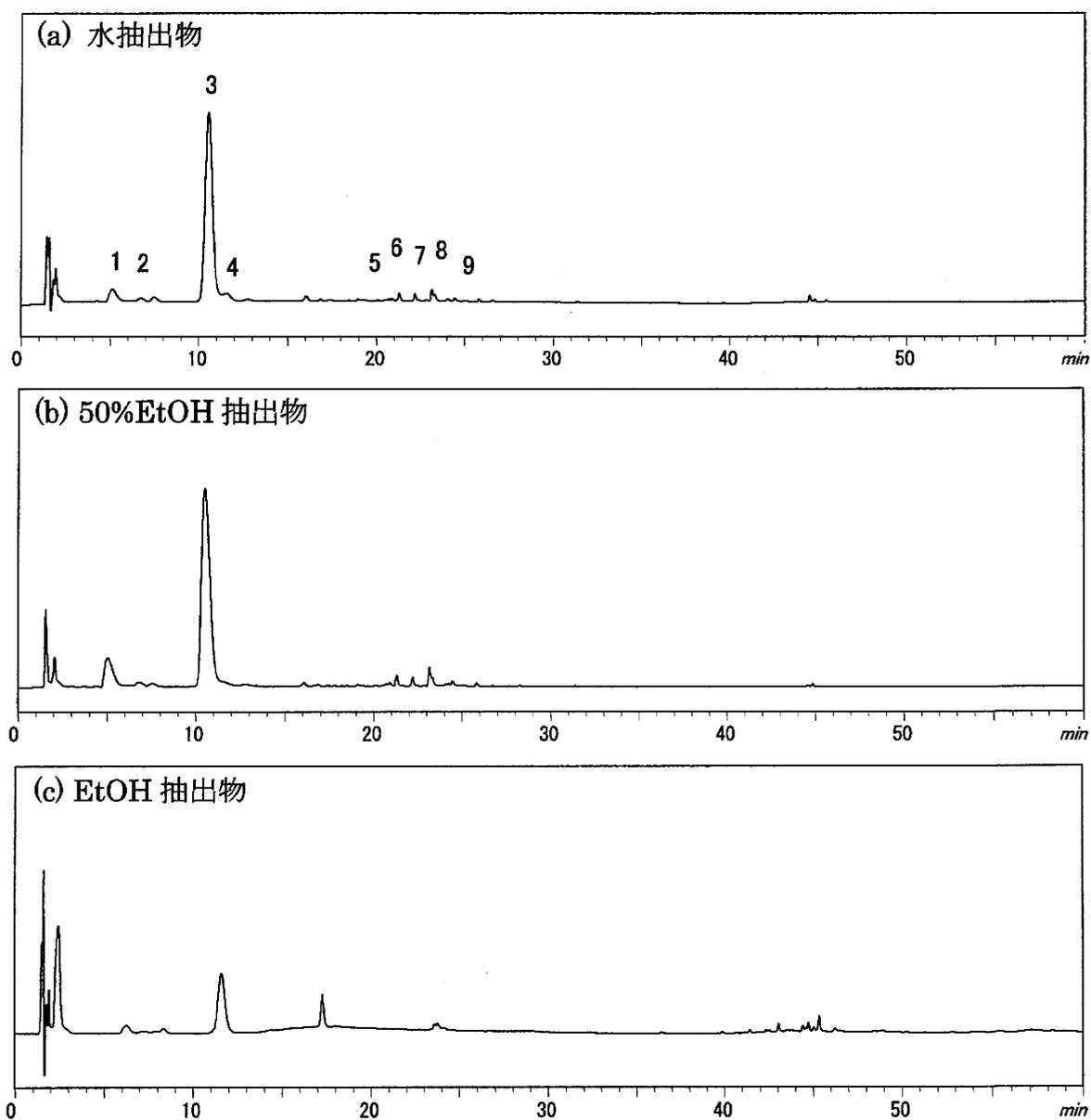


図 1. ヒマワリ種子抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長: 280 nm)
 (a) 水抽出物, (b) 50%エタノール抽出物, (c) エタノール抽出物
 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

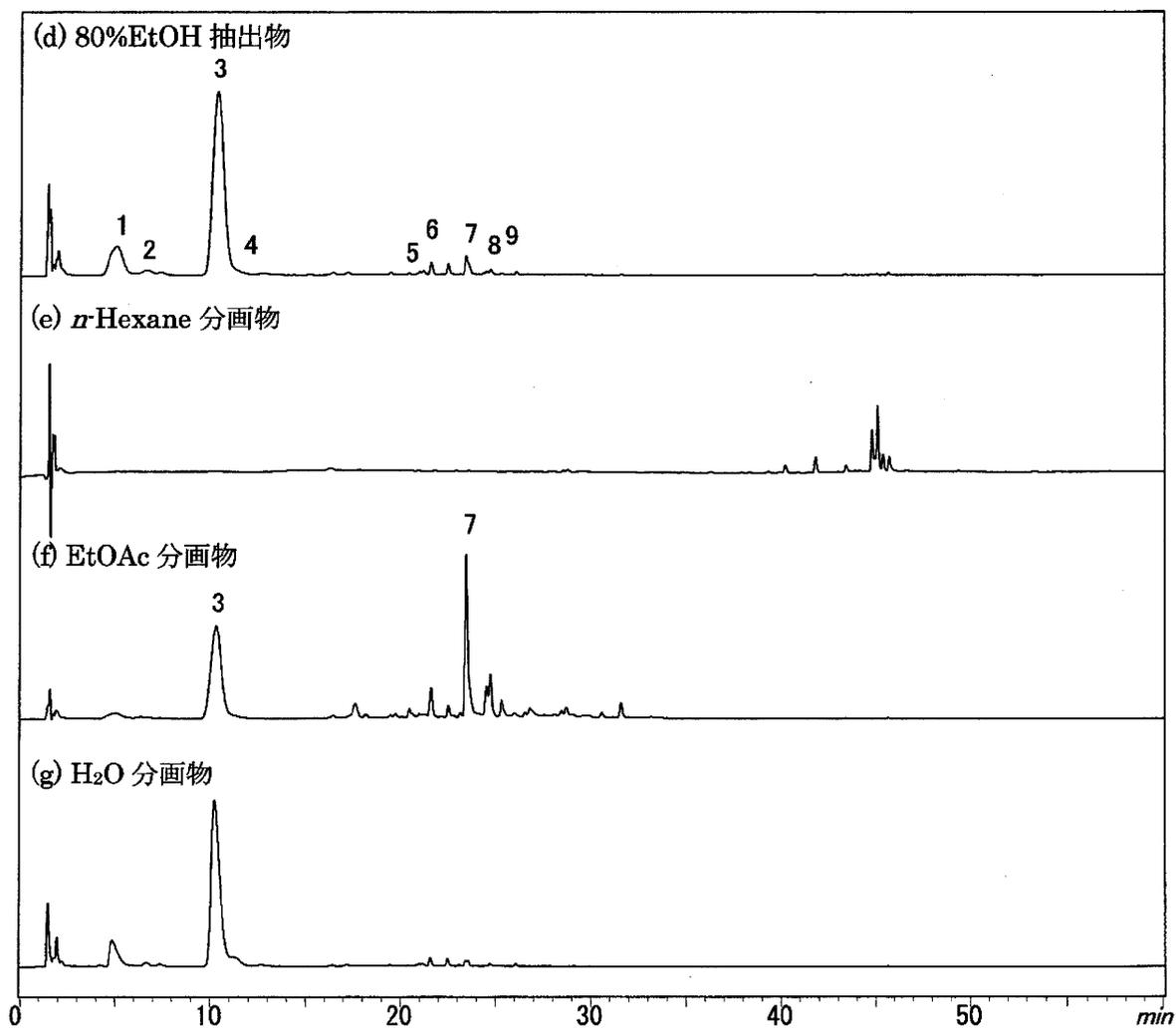


図1(続き). ヒマワリ種子抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム(検出波長:280 nm)
 (d) 80%エタノール抽出物, (e)80%エタノール抽出物-*n*ヘキサン分画物,
 (f) 80%エタノール抽出物-酢酸エチル分画物, (g) 80%エタノール抽出物-水分画物
 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

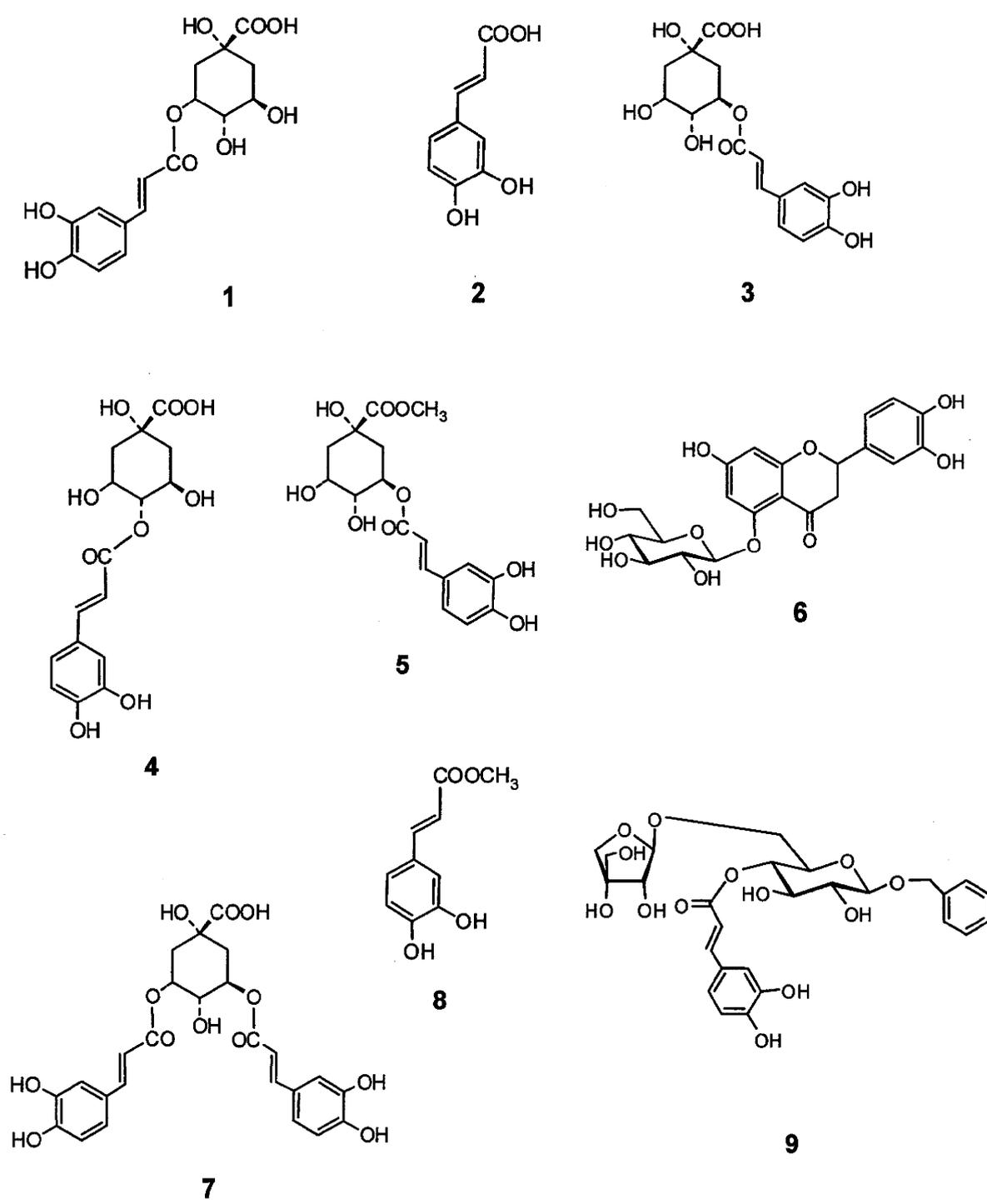


図 2. 化合物 1~9 の化学構造