

図 3a. 化合物 9 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

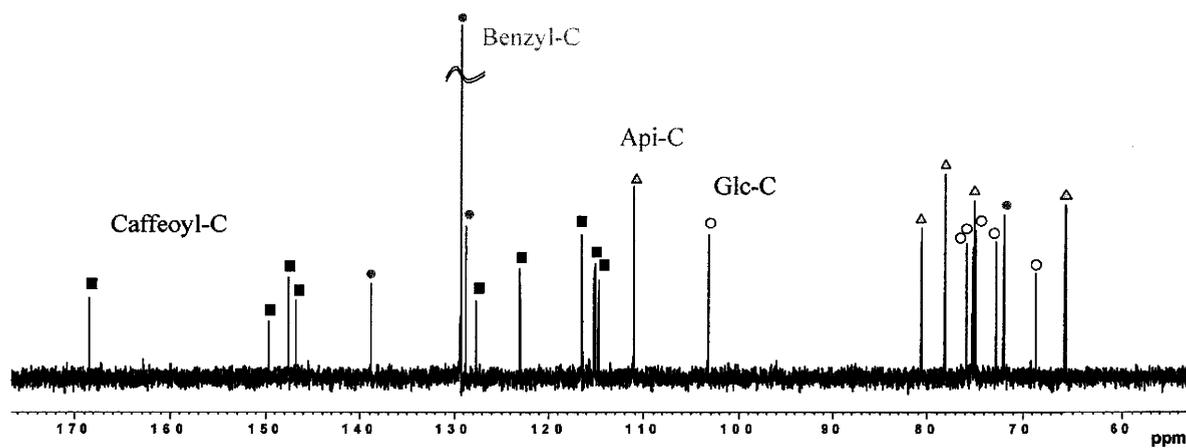


図 3b. 化合物 9 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (126 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

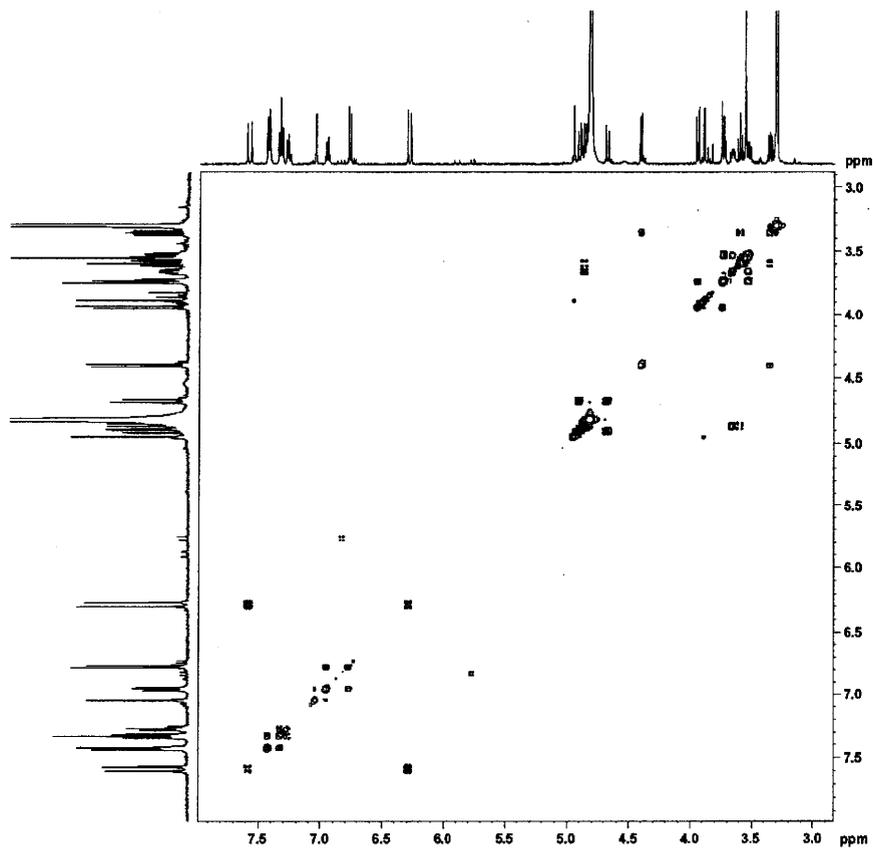


図 3c. 化合物 9 の ^1H - ^1H COSY スペクトル (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

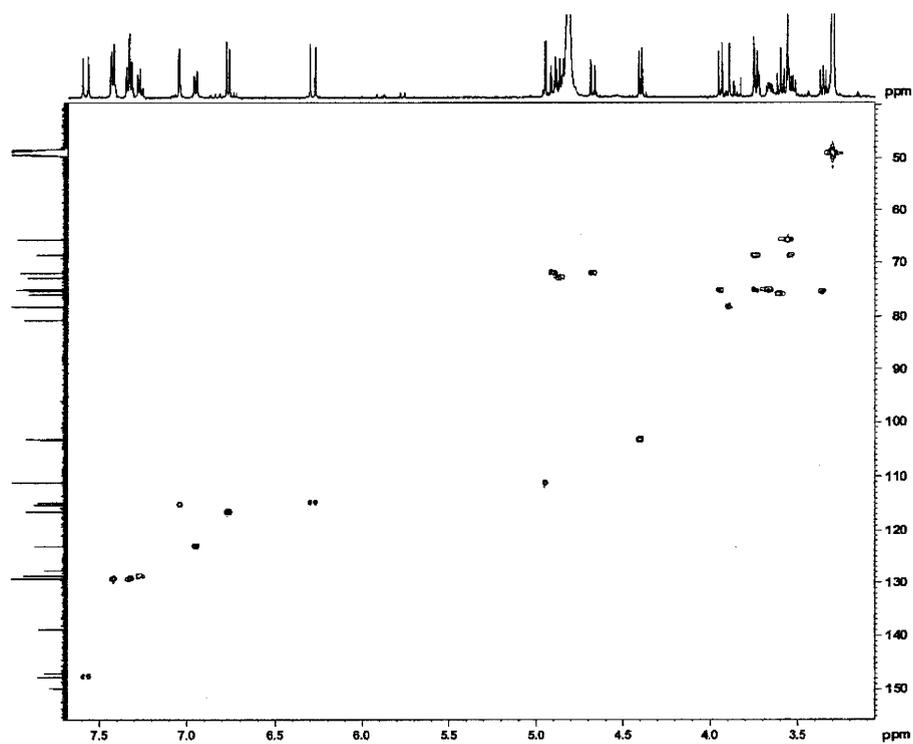


図 3d. 化合物 9 の HSQC スペクトル (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

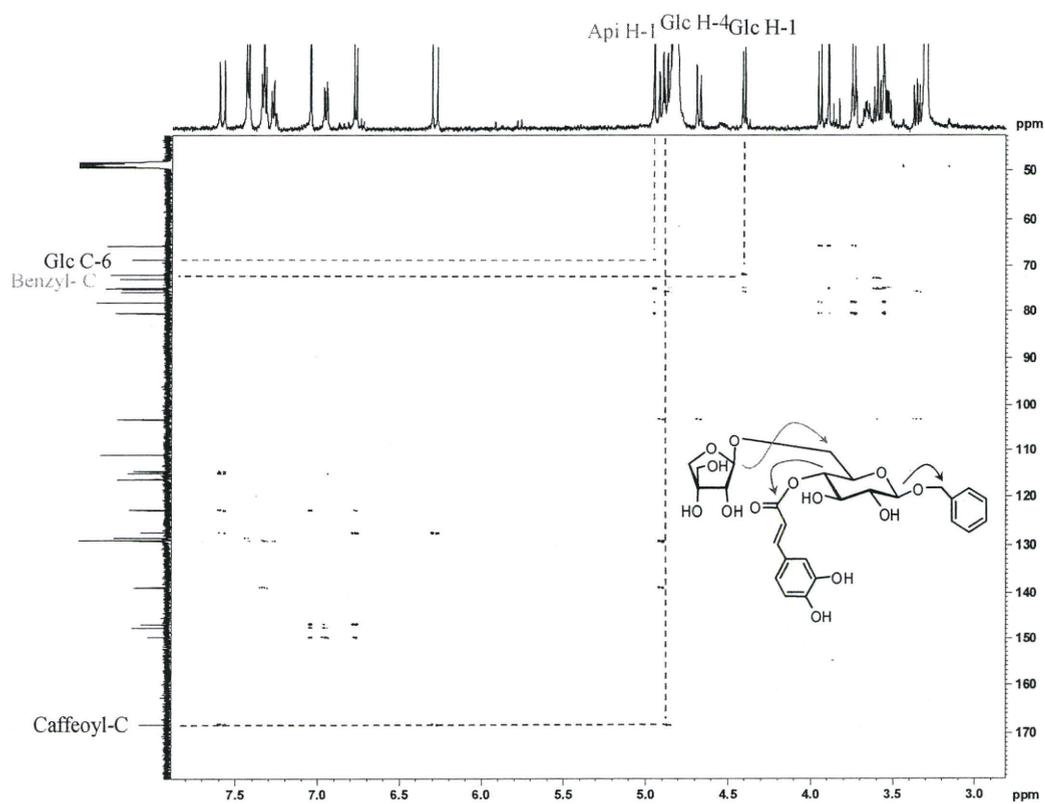


図 3e. 化合物 9 の HMBC スペクトル (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

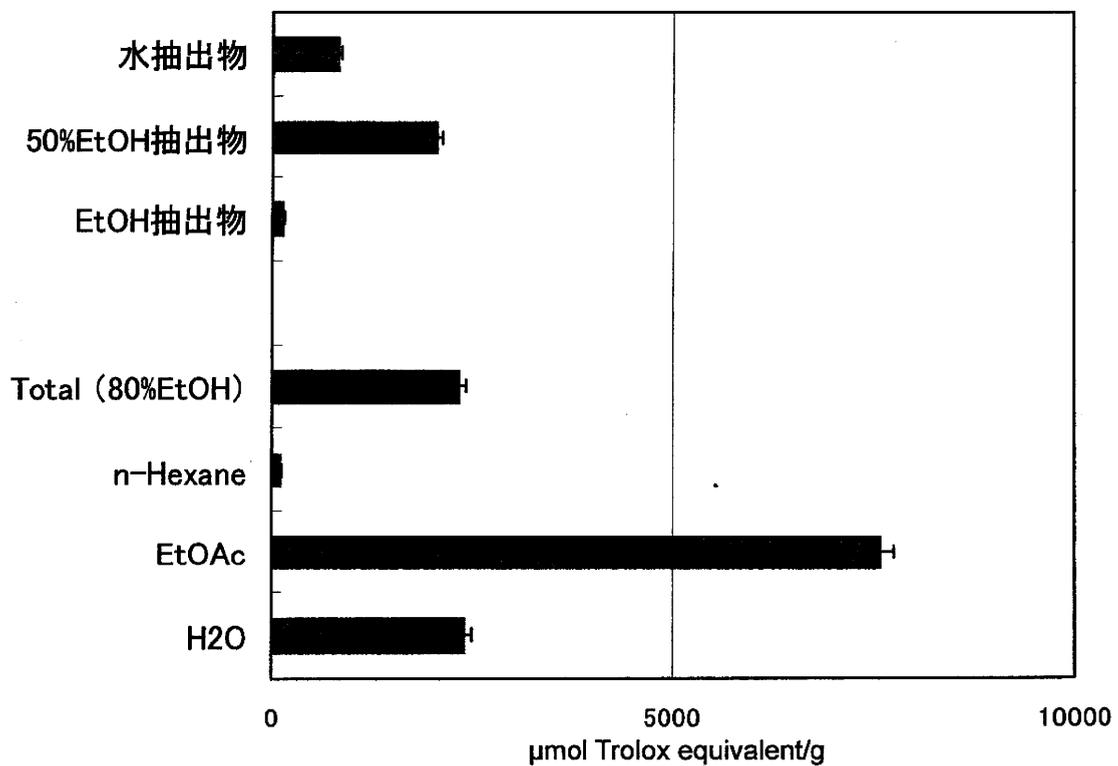


図 4. 各抽出物および分画物の抗酸化能 (ORAC 値)

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

ローズマリー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

既存添加物名簿記載の酸化防止剤ローズマリー抽出物の製法による成分分布を精査する目的で、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以外の抽出物において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* と同定した。またその他、検出した成分として、*carnosol* が同定された。

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* 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。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。

研究協力者

吉田隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

ローズマリーは、ヨーロッパ南部地中海沿岸地方に自生あるいは栽培されるシソ科マンネンロウ *Rosmarinus officinalis* L. の葉を基原とし、シネオールなどからなる精油やシ

ソ科タンニンなどの含有が知られている。強い芳香が肉料理によく合い、スパイスとして使用される他、芳香健胃、駆風、鎮静などの作用が知られ、西洋で民間薬としても使われている。

一方で、食品添加物としても利用されており、ローズマリー抽出物（マンネンロウ抽出物）として、酸化防止剤を用途に既存添加物

名簿に記載されている。既存添加物名簿にローズマリー抽出物は、「シソ科マンネンロウ (*Rosmarinus officinalis* L.) の葉又は花より、二酸化炭素、温時～熱時含水エタノール若しくはエタノールで抽出して得られたもの、又は温時～熱時ヘキサン、メタノール若しくは含水メタノールで抽出し、溶媒を除去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 (ロスマノール、カルノソール及びカルノシン酸等) である」と記載されている。酸化防止剤ローズマリー抽出物の含有成分に関する研究は、平成 19 年度の厚生労働科学研究において、抗酸化活性成分に関する研究が実施され、その成分としてロスマリン酸、カルノソール、カルノシン酸が報告されている。本研究では、これまでの報告を踏まえ、製法と有効性 (指標成分) の関係を明確にするための科学的データのさらなる追及を目的に検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

ローズマリーの原料は、長岡香料株式会社より供与いただいたものを用いた。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。標準品の rosmarinic acid, carnosol, carnosic acid はフナコシより得た。

2. 装置及び測定条件

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. × 150 mm, 5 μm) (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%)].

3. 試料の調製

原料のローズマリーをブレンダーで粉碎し、その 2 g にエタノール, 50%エタノール, メタノール, 50%メタノール, 水, ヘキサン (40 mL) をそれぞれ加え、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、凍結乾燥または減圧乾燥し、各試料 (エタノール抽出物, 50%エタノール抽出物, メタノール抽出物, 50%メタノール抽出物, 水抽出物, ヘキサン抽出物) とした。

分画用の試料は、ローズマリー (50 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)] (500 mL) で抽出後、*n*-ヘキサン (150 mL), 酢酸エチル (150 mL) 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 (954 mg), 酢酸エチル分画物 (823 mg), 水分画物 (3.6 g)] を得た。この水分画物 (2.1 g) について MCI-gel CHP20P カラムクロマトによる分離精製を行い、nepitrin (1) (44.8 mg), rosmarinic acid (2) (95.2 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。これらおよび入手できた化合物を標品とし、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. 主含有成分の単離, 同定

調製したローズマリー抽出物(エタノール抽出物, 50%エタノール抽出物, メタノール抽出物, 50%メタノール抽出物, 水抽出物, ヘキサン抽出物)について, 各 HPLC クロマトグラムを比較した. その結果を図 1 (a~f) に示す. 水, ヘキサン抽出物を除く抽出物において, 1つの主要ピーク(保持時間 約 25 分)が共通して観察された. これらピークを同定するための標品を得る目的で, ローズマリーの 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 (g~j) 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. これら検出された主な成分を明らかにするために, カラムクロマトによる分離, 精製を行い, 計 2 種類の化合物を単離することが出来た. 化合物 1, 2 については, MS, NMR データに基づいた構造解析により同定した. また化合物 3, 4 については標品との直接比較により同定した.

1: nepitrin (6-methoxyluteolin 7-glucoside)

2: rosmarinic acid

3: carnosol

4: carnosic acid

各化合物の構造式を図 2 に示す. 以下に化合物 1, 2 の分析データを記す.

Nepitrin (6-Methoxyluteolin 7-glucoside) (1) :
 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 7.30 (1H, brs, H-2'), 7.29 (1H, brd, $J=8$, H-6'), 6.83 (1H, d, $J=8$, H-5'), 5.08 (1H, d, $J=8.5$, glc H-1), 3.97 (1H, dd, $J=2$, 12, glc H-6), 3.73 (1H, dd, $J=8$, 12, glc H-6), 3.80, (1H, m, glc H-5), 3.41 (1H, m, glc H-4), 3.57-3.59 (2H, m, glc H-2, 3), 3.86 (3H, s, -OMe). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 184.1 (C-4), 166.7 (C-2), 157.7 (C-7), 154.1 (C-5), 153.9 (C-9), 151.0

(C-4'), 146.9 (C-3'), 134.0 (C-6), 123.4 (C-1'), 120.5 (C-6), 116.7 (C-5'), 114.3 (C-2'), 107.4 (C-10), 103.7 (C-3), 102.0 (glc C-1), 95.7 (C-8), 78.4, 77.9 (glc C-3, 5), 74.7 (glc C-2), 71.3 (glc C-4), 62.6 (glc C-6), 61.5 (-OMe). ESI-MS m/z 477 [M-H].

Rosmaninic acid (2) : $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) 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].

2. 調製抽出物の成分分布

ローズマリー各抽出物の HPLC クロマトグラム [図 1 (a~f)] を比較したところ, 水, ヘキサン抽出物以外において, 保持時間 25 分付近の主要ピークが検出された. このピークを単離, 構造解析したところ, rosmarinic acid (2) と同定された. またその他の成分として, nepitrin (1), carnosol (3), carnosic acid (4) を同定した. 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 (g~j)]. その結果, 主要成分である 2 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, ほぼ 2 のみの検出であった. 一方, 3, 4 はヘキサン分画物から検出された.

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, 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)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 (a)に示す。ORAC 測定の結果, 有機溶媒のみよりも, 含水の方の抗酸化能が強い傾向が認められた。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かった。図 1 (i)に示すように, この分画物には主ピークとして rosmarinic acid (2) がほぼ 1 ピークとして検出されており, 有効(指標)成分である可能性が示唆された。そこで, 2 について, 同様に抗酸化能を評価した。図 3 (b)に示すように, 代表的な抗酸化活性茶カテキン類として知られる epigallocatechin gallate (EGCG) よりも 2 倍以上強い抗酸化能を示した。それゆえ, 2 が指標成分の一つであることが示唆された。またヘキサン分画物に主に検出された carnosol (3)および carnosic acid (4), 単離した nepitrin (1)についても抗酸化活性を測定した。その結果, 1, 4 ともに EGCG と同等の抗酸化活性が認められ, 3 も ascorbic acid よりも強い活性を認めた。

D. 考察

調製した抽出物の中では, 有機溶媒のみよりも含水溶媒による抽出物の方が, 抗酸化活性が強い傾向が認められた。またそれらの活性成分として rosmarinic acid (2) が同定された。一方で, 水抽出物にも抗酸化活性が認められたが, 2 以外の数ピークが認められており, それ以外の化合物の効果も考えられる。またヘキサン抽出物の抗酸化活性は弱かったが, これまで抗酸化物質としての報告もあり名簿にも記載されている carnosol (3) や carnosic acid (4) の検出が認められた。今回

の検討においても, これら化合物自体に抗酸化活性が認められていることから, 酸化防止効果への寄与が考えられる。一方で, エキス全体から見ると, これら含有画分の活性は強くなかった。分画物の評価をみると, 酢酸エチル分画の抗酸化活性が顕著に強く, 検出成分として 2 がメインであることを考慮すると, 指標成分として示唆される。

既存添加物名簿には, 本添加物については「有効成分は, フェノール性ジテルペノイド(ロスマノール, カルノソール及びカルノシン酸等)である」とあるが, 2 も有効成分であることが本研究結果からも示唆された。その成分分布からみると, 2 とフェノール性ジテルペンのいずれも含有したエキスを調製するには, エタノールで抽出する方法が適当であるといえる。ほどよい水溶性を追究し, より抗酸化効果の強いエキスの調製には含水アルコールが都合よく, 2 を指標として抽出効率を向上させることで, 抗酸化能の向上が計れることが考察された。一方で, 低極性画分に分布する 3 や 4 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。

E. 結論

酸化防止剤ローズマリー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, 各種抽出物(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)について比較検討した結果, その大半で主成分として rosmarinic acid (2) が検出された。抗酸化能を ORAC 測定により評価した結果, 含水アルコールで抗酸化活性が強い傾向が認められた。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, 2 が主

成分として検出された。その抗酸化能を評価したところ、顕著な抗酸化活性を示し、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) 奥田拓男編「天然薬物事典」、廣川書店、東京、1981.
- 2) 平成19年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「既存添加物の成分と品質評価に関する研究(分担報告書 酸化防止剤ローズマリー抽出物中に含まれる活性成分の同定).
- 3) 松藤 寛, 千野 誠, 山形一雄, 山崎 壮, 天然酸化防止剤ローズマリー抽出物中の活性成分と活性寄与率, 日本食品化学学会誌, 17, 164-170 (2010).

F. 研究業績

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところなし

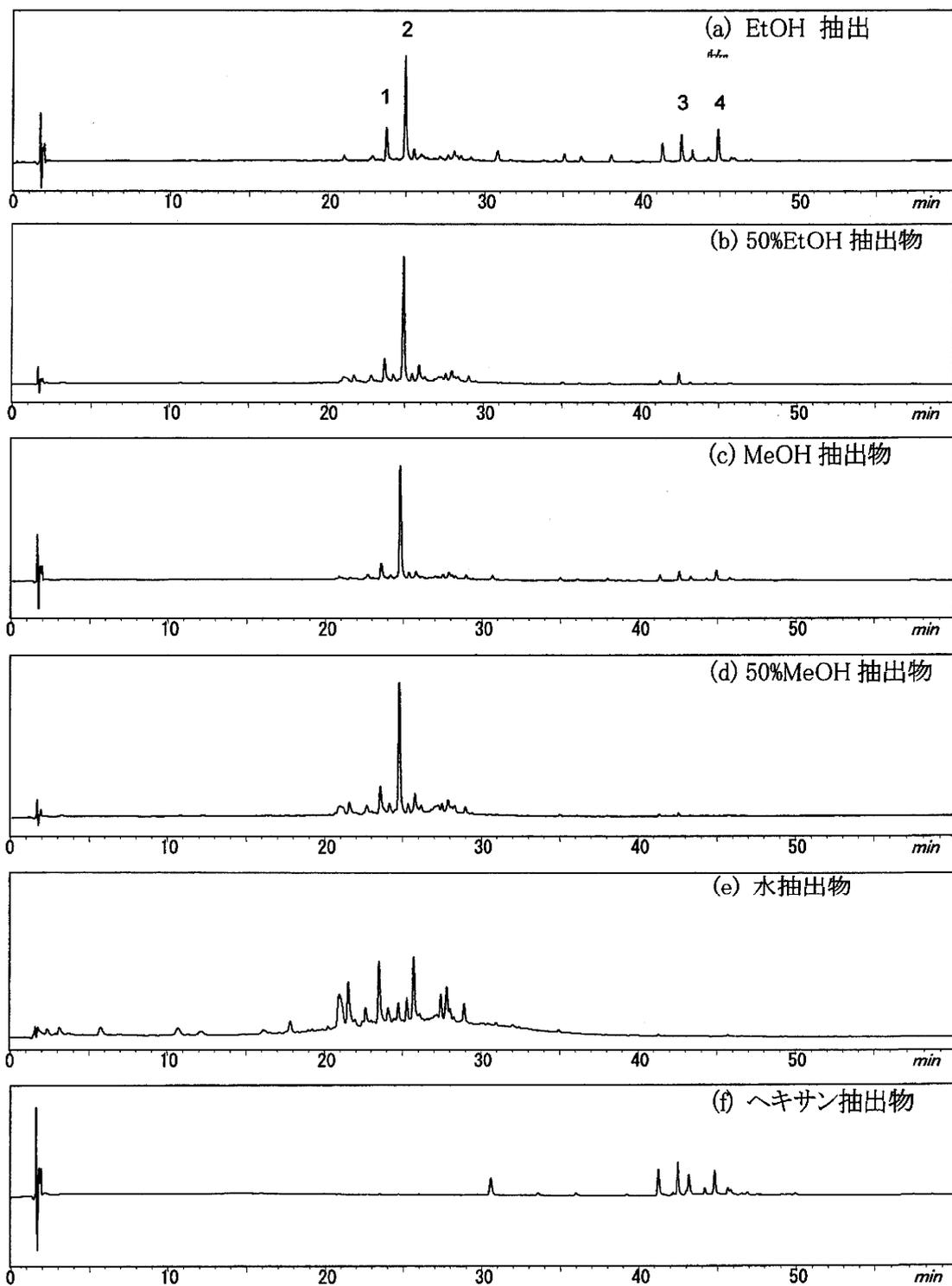


図 1. ローズマリー抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長: 280 nm)

(a) エタノール抽出物, (b) 50%エタノール抽出物, (c) メタノール抽出物, (d) 50%メタノール抽出物, (e) 水抽出物, (f) ヘキサン抽出物 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

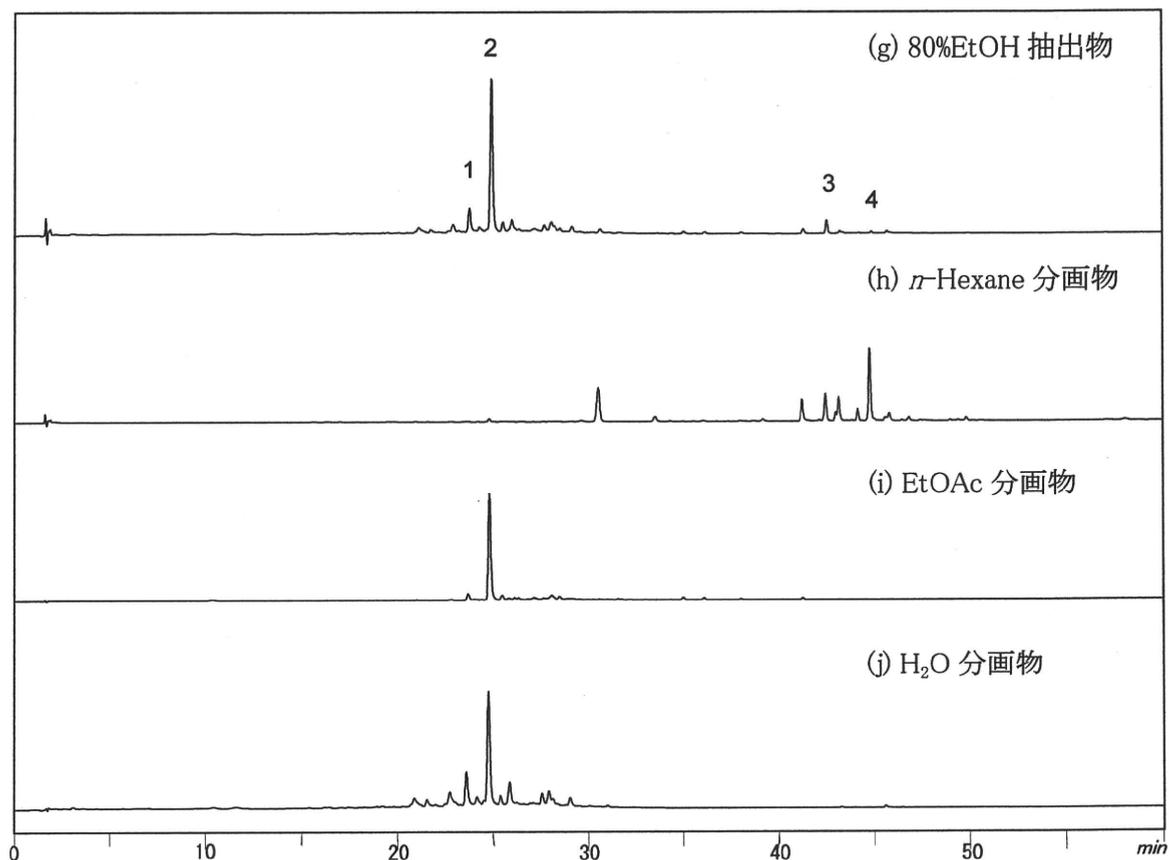


図 1(続き). ローズマリー抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム(検出波長:280 nm)

(g) 80%エタノール抽出物, (h) 80%エタノール抽出物-*n*-ヘキサン分画物, (i) 80%エタノール抽出物-酢酸エチル分画物, (j) 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)

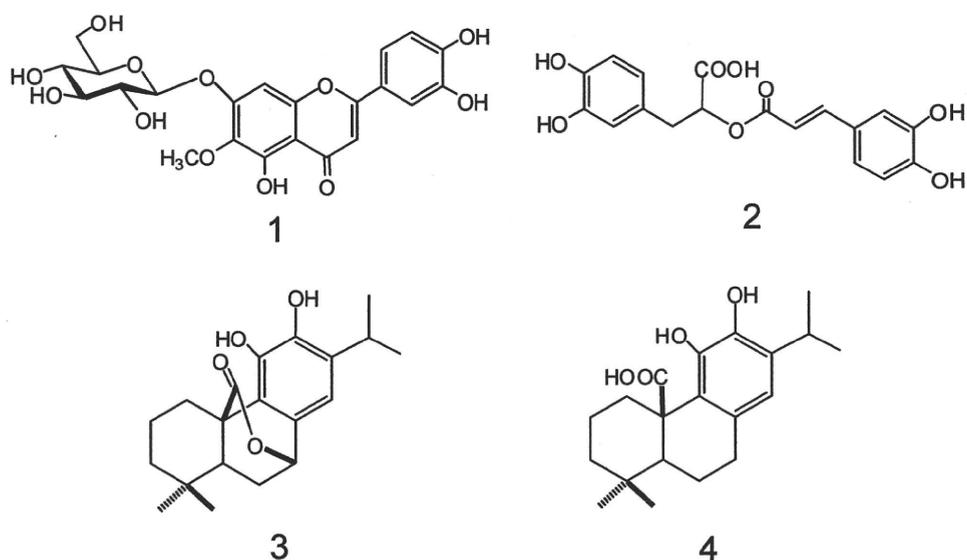


図 2. 化合物 1~4 の化学構造

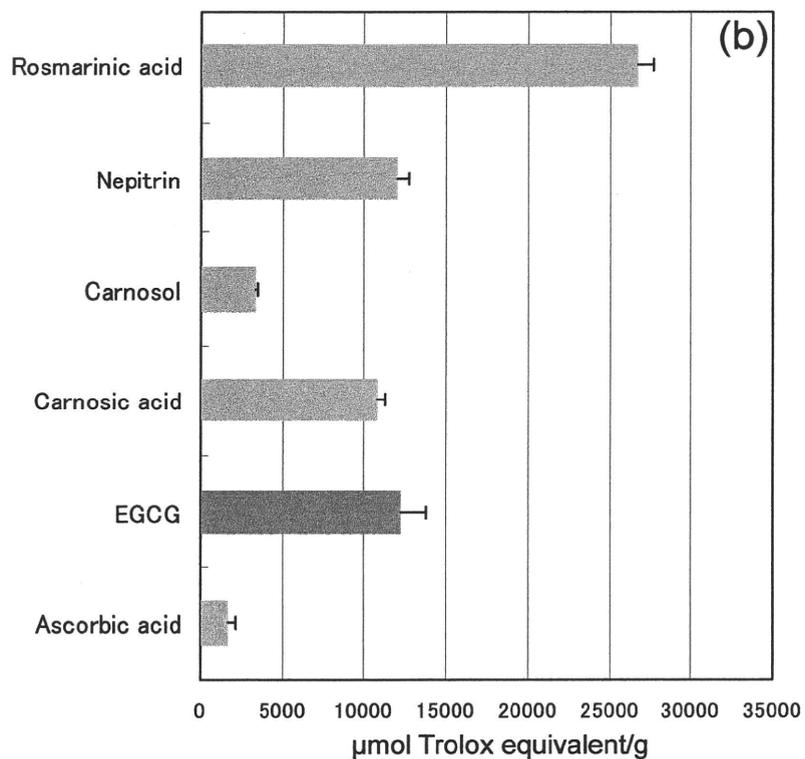
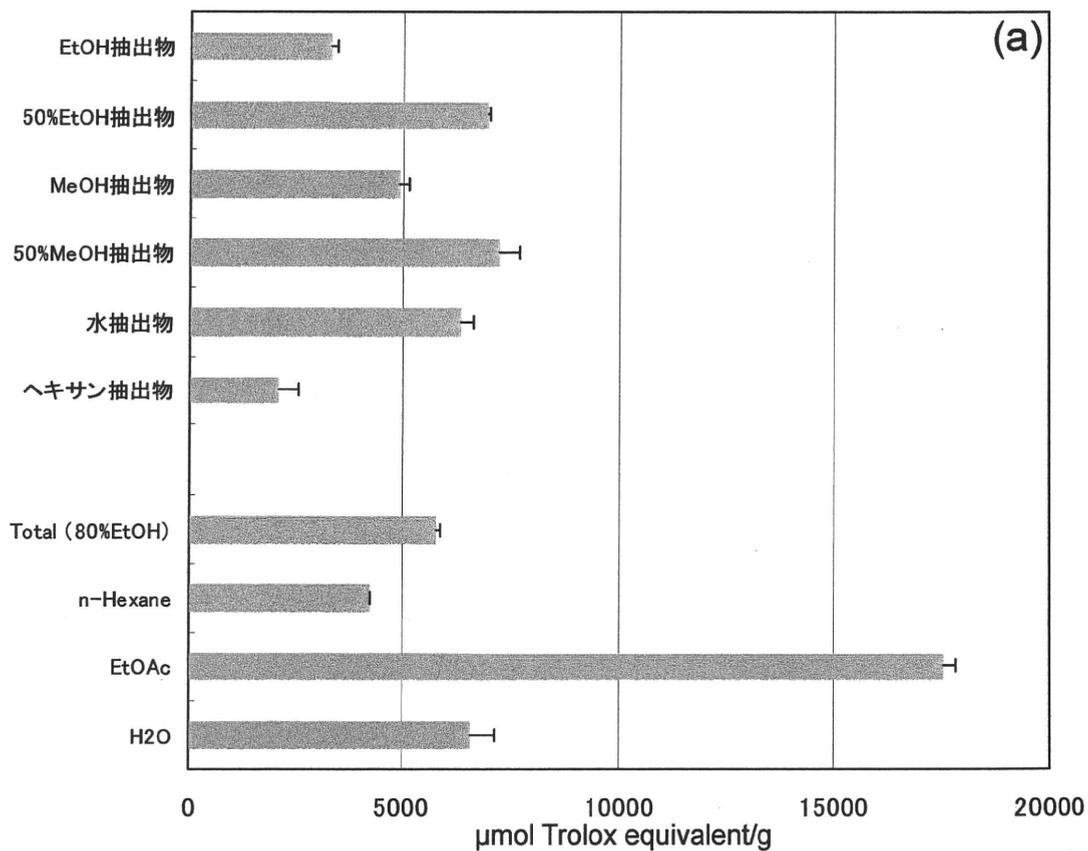


図3. 抗酸化能(ORAC値)
 (a) 各抽出物および分画物, (b) 化合物

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

チャ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

既存添加物名簿記載の酸化防止剤チャ抽出物の製法による成分分布を精査する目的で、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, gallic acid (GA), gallic acid gallate (GAG), 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 (ORAC 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。

研究協力者

吉田隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

ツバキ科チャ (*Camellia sinensis*) は、チャノキとも言われ、日本人には最も馴染みのある植物性原料の一つで、日常的に「茶」飲料として広く利用される常緑低木である。茶葉

には、カフェインなどのプリン塩基、茶タンニンと呼ばれるカテキン類、ビタミンC、アミノ酸などが含まれており、嗜好品として、さらには生活習慣病やがん予防に有効な保健飲料として飲用されている。一方で、食品添加物としても利用されており、チャ抽出物 (ウーロンチャ抽出物, 緑茶抽出物) として酸化防止剤、製造用剤を用途に既存添加物名

簿に記載されている。

既存添加物名簿にチャ抽出物は、「ツバキ科チャ (*Camellia sinensis* O.KZE.) の葉より製した茶より、室温時、温時又は熱時、水、酸性水溶液、含水エタノール、エタノール、含水メタノール、メタノール、アセトン、酢酸エチル又はグリセリン水溶液で抽出したものより得られたものである。成分としてカテキン類を含む」と記載されており、他の既存添加物と比べると製法の範囲が広い。しかし、これら製法を比較して、添加物としての有効性を考察した例はない。チャ抽出物の含有成分に関する研究は、平成 19 年度の厚生労働科学研究において抗酸化成分に関する研究が実施され、gallicocatechin (GC), epigallocatechin (EGC), epigallocatechin gallate (EGCG), gallicocatechin gallate (GCG), epicatechin gallate (ECG) の存在が明らかにされ、これらが主要な抗酸化成分であることが報告されている。本研究では、これまでの報告を踏まえ、製法と有効性(指標成分)の関係を明確にするための科学的データの追及を目的に検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

チャ(緑茶)の原料は、長岡香料株式会社より供与いただいたものを用いた。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。標準品の *caffeine* はフナコシより得た。茶カテキン類(+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG) , (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) , (-)-catechin gallate (CG), (-)-gallicocatechin (GC), (-)-gallicocatechin gallate (GCG) は長良サイエンス製を用いた。

2. 装置及び測定条件

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. × 150 mm, 5 μm) (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%)].

3. 試料の調製

原料の茶葉をブレンダーで粉碎し、その 2 g に水、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 (40 mL) をそれぞれ加え、20 分間超音波処理した。熱湯抽出は、茶葉粉碎物 4 g に熱湯 (80 mL) を加え、加温下 5 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、凍結乾燥または減圧乾燥し、各試料(水抽出物、熱湯抽出物、50%エタノール抽出物、エタノール抽出物、メタノール抽出物、アセトン抽出物、酢酸エチル抽出物)とした。

分画用の試料は、茶葉 (50 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)] (500 mL) で抽出後、*n*-ヘキサン (150 mL), 酢酸エチル (150 mL) 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 (1.2 g), 酢酸エチル分画物 (2.3 g), 水分画物 (7.1 g)] を得た。

化合物の同定は、標品との直接比較により行った。

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 ($\mu\text{mol TE/g}$) で表した。

C. 研究結果

1. 調製抽出物の成分分布

調製した茶葉の抽出物 (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 HPLC クロマトグラムを比較した。その結果を図 1 (a~g) に示す。ほぼ全ての抽出物において、3 つの主要ピーク (保持時間 約 13, 15, 19 分) が共通して観察された。これらピークについて、標品と照合しながら精査したところ、epigallocatechin gallate (EGCG) (3), caffeine (5), epicatechin gallate (ECG) (7) とそれぞれ同定した。その他の成分として、epigallocatechin (1), catechin (2), epicatechin (4), gallic acid (6), catechin gallate (8) が検出された。化学構造式を図 2 に示す。分画試料用に調製した 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 (h~k)]。その結果、*n*-ヘキサンおよび酢酸エチル分画物で主ピーク 3 本が検出されたが、*n*-ヘキサン分画物のピーク強度は非常に弱かった。一方、酢酸エチル分画物は顕著なピーク強度で 3 化合物を検出した。また水分画物については、5 が主として検出され、次いで 3 が観察された。

2. 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, 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) 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 (a) に示す。ORAC 測定の結果、全体

的に強い抗酸化能が認められたが、アセトンや酢酸エチル抽出物の抗酸化能は他の抽出物と比較して約半分程度の ORAC 値であった。

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かった。図 1 (j) に示すように、この分画物には主ピークとして検出された EGCG (3), caffeine (5), ECG (7) が検出されており、これらが有効 (指標) 成分である可能性が示唆された。そこで、これら 3 化合物について、同様に抗酸化能を評価した。その結果を図 3 (b) に示す。ORAC 測定の結果、5 の ORAC 値は低く、それに対して 3, 7 は顕著に高かった。コントロールの酸化防止剤 ascorbic acid と比較すると、高い抗酸化能を示すことがわかる。それゆえ、指標成分として、3 および 7 があげられることが示唆された。

D. 考察

各抽出物の中では、水、アルコールまたは含水アルコールによる抽出物が、より抗酸化能の高い結果となった。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、3 つの主ピークが検出され、EGCG (3), caffeine (5), ECG (7) と同定された。これら 3 化合物の抗酸化活性を評価すると、3 および 7 の活性が強く、一方で 5 の抗酸化活性はほとんど示されなかった。

既存添加物名簿には、本添加物については「成分としてカテキン類を含む」とあるが、3 および 7 を主とするこれらカテキン類が有効成分であることも本研究結果から示唆された。3 も強い抗酸化成分として知られているが、7 の ORAC 値は、3 の 2 倍程度あり、7 がいかに高い抗酸化活性を示すかがわかる。マイ

ナーピークとして、その他のカテキン類の分布も認められた。それゆえ、本抗酸化活性には、**3**および**7**を主成分としたカテキン類が寄与していることが示唆された。

以上の結果から、チャ抽出物を調製する場合、アセトンや酢酸エチルといった有機溶媒のみで抽出するよりも、水、アルコールまた含水アルコールで抽出する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**3**および**7**を主成分としたカテキン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

酸化防止剤チャ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、茶葉の水、熱湯、50%エタノール、エタノール、メタノール、アセトン、酢酸エチル抽出物について比較検討した結果、いずれも主成分として、EGCG (**3**)、caffeine (**5**)、ECG (**7**) が検出された。抗酸化能を ORAC 測定により評価した結果、ほぼ全ての抽出物で抗酸化能を示したが、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、**3**、**5**、**7** が主成分として検出され、その他のカテキン類もマイナー成分として検出された。3 化合物について抗酸化能を評価したところ、**5** を除く化合物 (**3**、**7**) は顕著な抗酸化活性を示し、これらが抗酸化能に寄与していることが示唆された。

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) 平成19年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「既存添加物の成分と品質評価に関する研究(分担報告書 チャ抽出物の抗酸化成分に関する研究)」.

F. 研究業績

1. 論文発表
現在のところなし
2. 学会発表
現在のところなし

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところなし

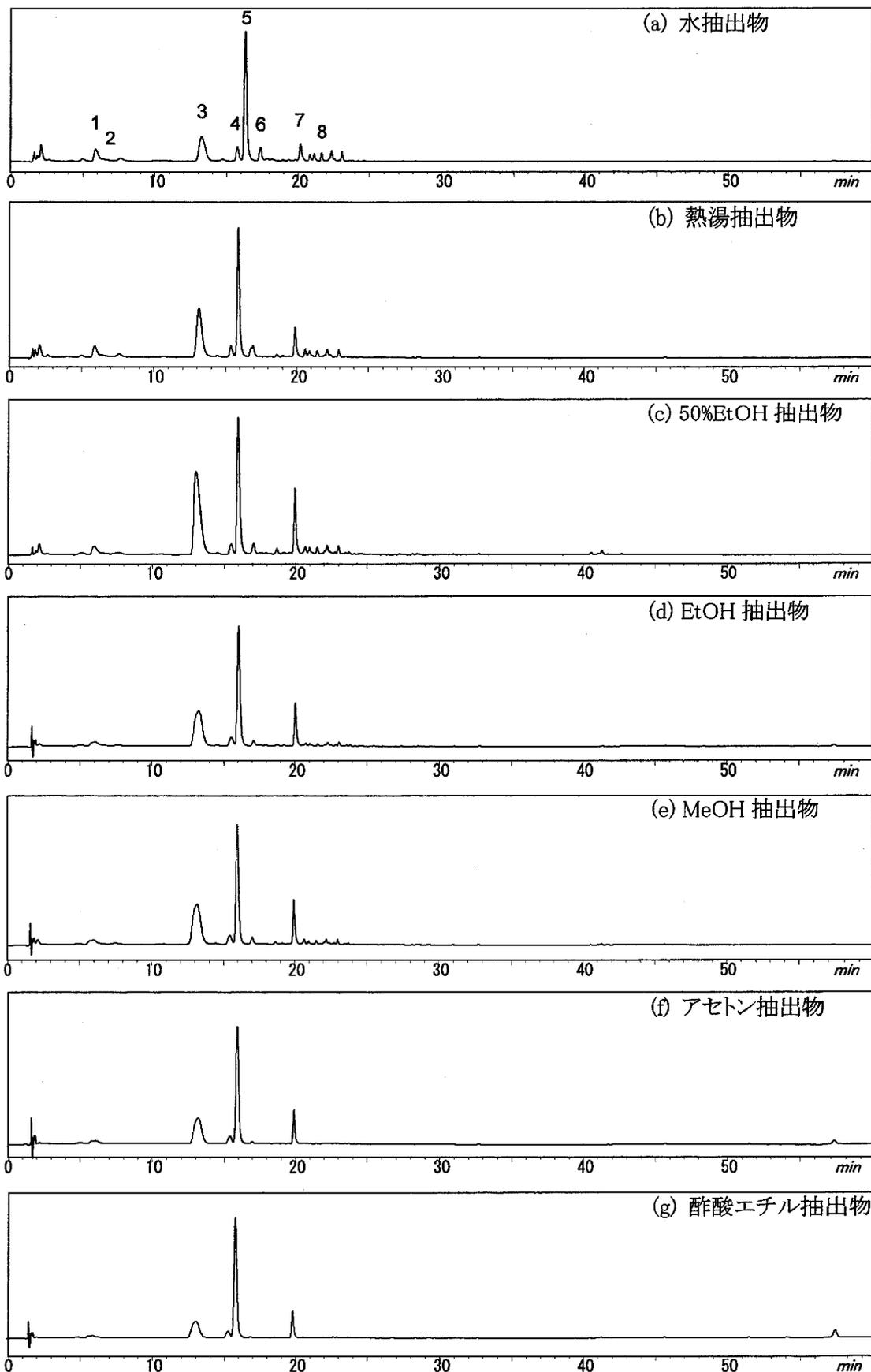


図 1. チャ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長: 280 nm)

(a) 水抽出物, (b) 熱湯抽出物, (c) 50%エタノール抽出物, (d) エタノール抽出物, (e) メタノール抽出物, (f) アセトン抽出物, (g) 酢酸エチル抽出物 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

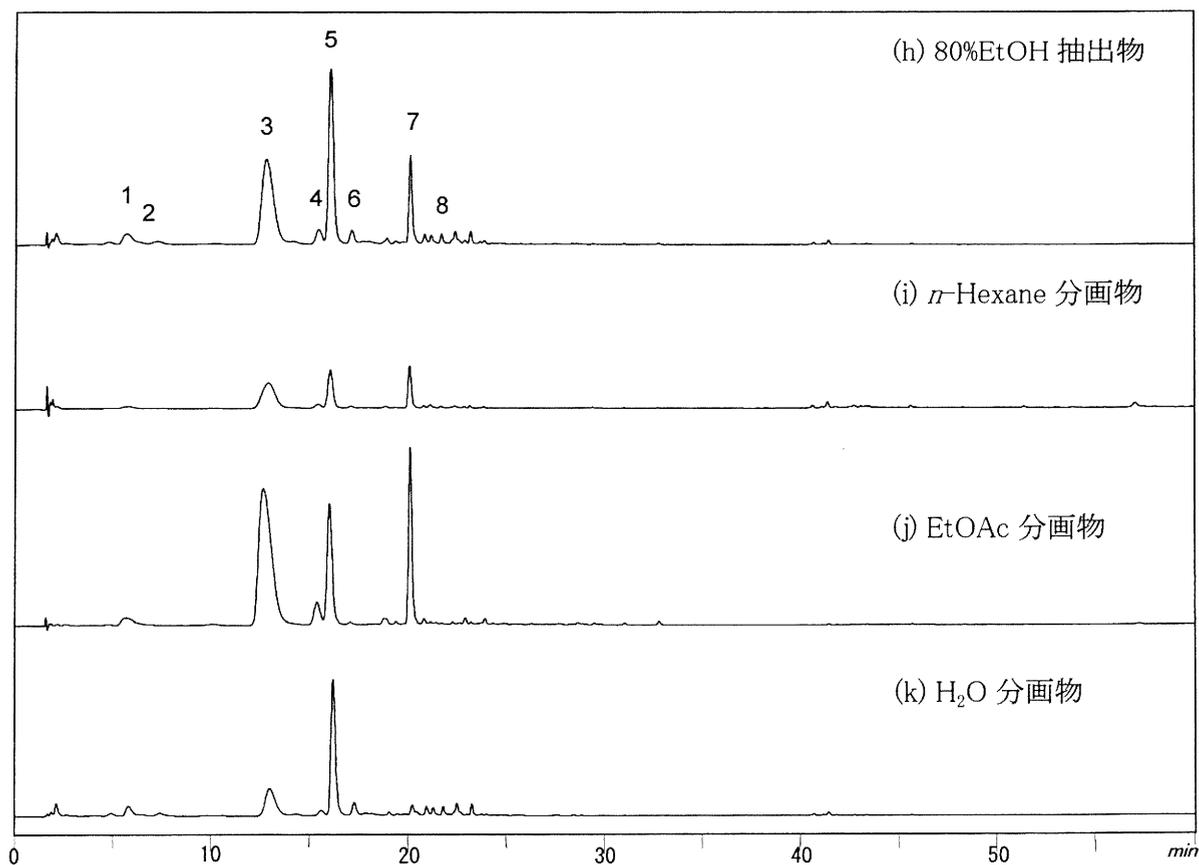


図1(続き). チャ抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム(検出波長:280 nm)

(h) 80%エタノール抽出物, (i) 80%エタノール抽出物-*n*-ヘキサン分画物, (j) 80%エタノール抽出物-酢酸エチル分画物, (k) 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)

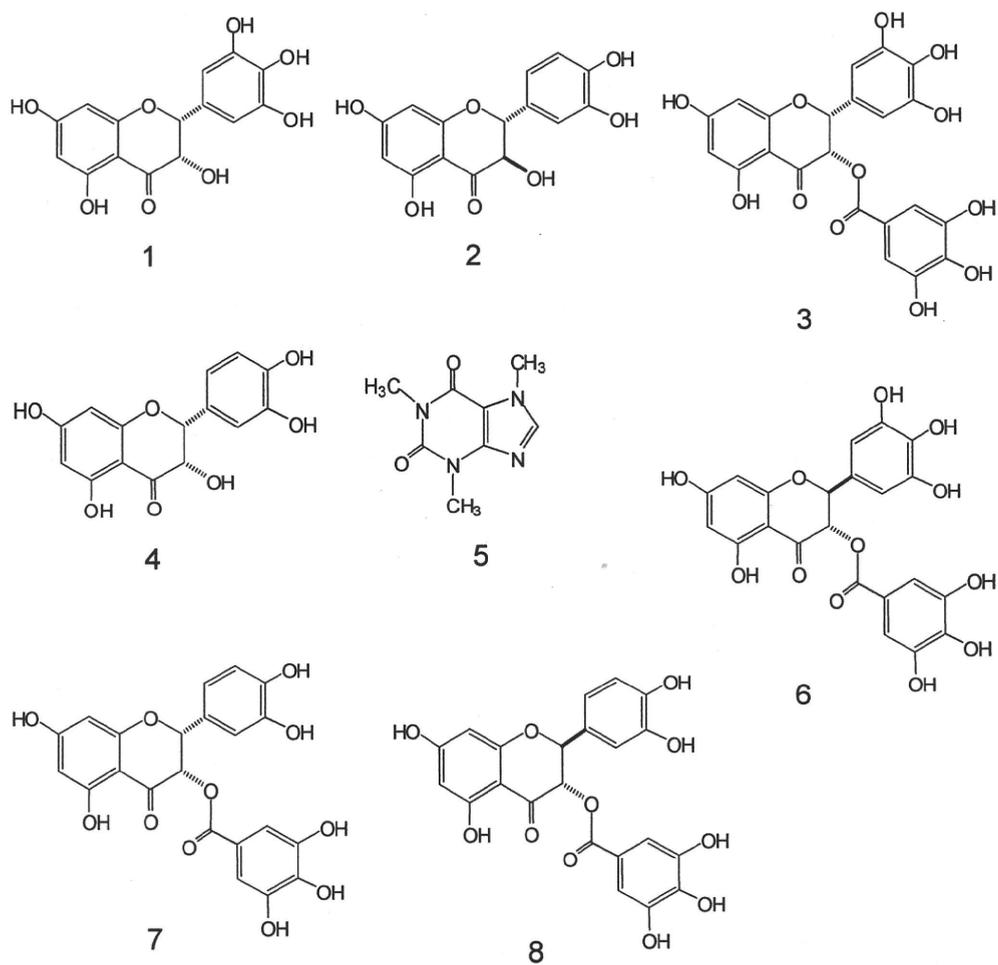


図 2. 化合物 1~8 の化学構造

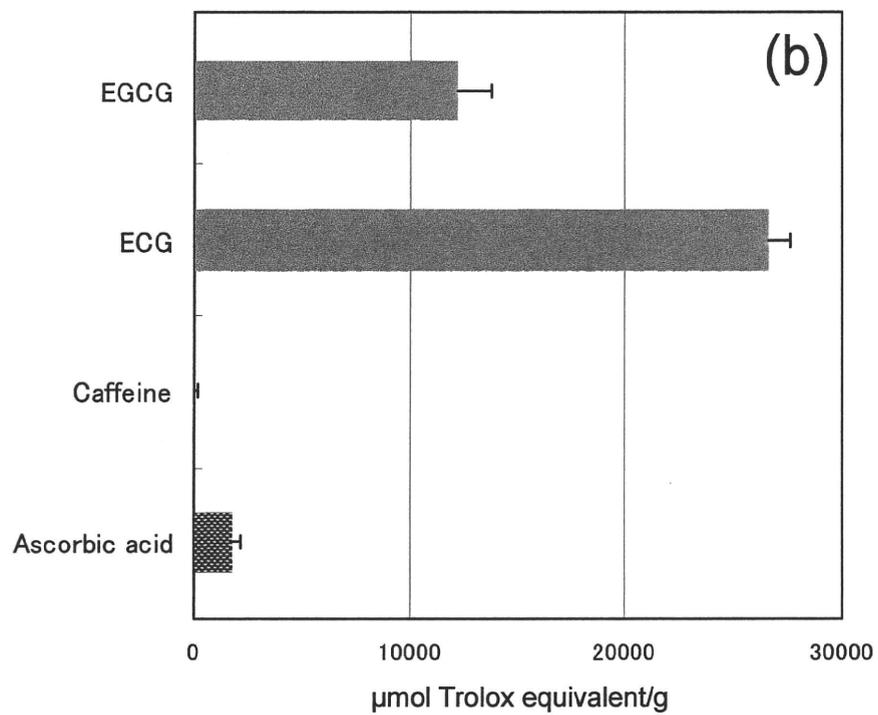
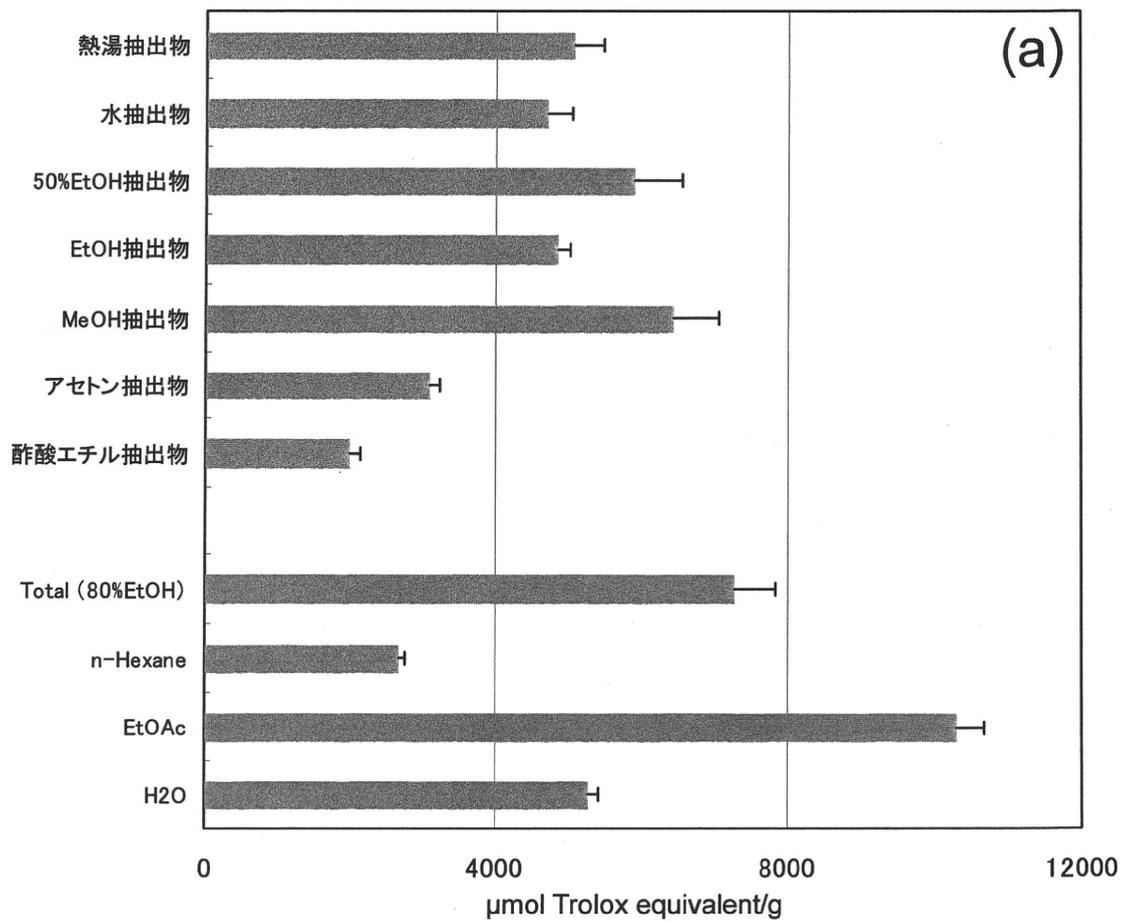


図 3. 抗酸化能(ORAC 値)

(a) 各抽出物および分画物, (b) 化合物