

201033050B

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 21～22 年度 総合研究報告書

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

平成 23 (2011) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 9

III. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 10

I. 総合研究報告書

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 21～22 年度の 2 年計画で 10 品目（ドクダミ、セージ、ウイキョウ、ピメンタ、クローブ、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。

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、*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。

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活性を評価したところ、EGCG, ECG に強い抗酸化活性が認められたが、caffeine の抗酸化活性は低かった。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。

生コーヒー豆抽出物についても、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、調製した抽出物すべてにおいて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 がほぼ主1ピークで検出され、主成分であることが示された。他マイナー成分として EGCG などポリフェノール成分が検出された。

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、安心に繋がることを示唆される。

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計画した。21 年度はドクダミ、セージ、ウイキョウ、ピメンタ、クローブ、22 年度はヒマワリ種子、チャ、ローズマリー、生コーヒー豆、ヤマモモを対象に、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、ドクダミ、セージ、ウイキョウ、ピメンタ、クローブヒマワリ種子、チャ、ローズマリー、生コーヒー豆、ヤマモモ、の10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. 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を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 [(2*S*)-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

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。

1-6. 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 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 \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。

1-7. 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、化学構造について精査したところ、rosmarinic acid と同定した。またその他の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。全体をみると、有機溶媒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。

1-8. 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 (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。

1-9. 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 (ORAC 活性) を評価したところ、全体的に抗酸化能が認められ、エタノール抽出物が最も強く、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。

1-10. 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及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 及びその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

検討した10原料（ヒマワリ種子、ローズマリー、チャ、生コーヒー豆、ヤマモモ、）抽出物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。ヒマワリ種子および生コーヒー豆では chlorogenic acid, ローズマリーでは rosmarinic acid, チャでは EGCG, ECG, ヤマモモでは myricitrin 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。

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、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。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。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。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抗酸化活性を示し、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) 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).
- 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) 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. 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).

- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 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
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
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	25-34	2011
Amakura Y., Yoshimura M., Ouchi K., Yoshida T.	Polyphenolics from sunflower seed extract	in preparation			
Yoshimura M., Amakura Y., Yoshida T.	Antioxidative constituents in clove and pimento	in preparation			

III. 研究成果の刊行物・別刷

Review

Structural Features and Biological Properties of Ellagitannins in Some Plant Families of the Order Myrtales

Takashi Yoshida *, Yoshiaki Amakura and Morio Yoshimura

College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, Bunkyo-cho, Matsuyama, Ehime 790-8578, Japan; E-Mails: amakura@cc.matsuyama-u.ac.jp (Y.A.); myoshimu@cc.matsuyama-u.ac.jp (M.Y.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: tyoshida@cc.matsuyama-u.ac.jp; Tel.: +81-89-925-7111; Fax: +81-89-926-7162.

Received: 21 November 2009; in revised form: 25 December 2009 / Accepted: 2 January 2010 /

Published: 6 January 2010

Abstract: Plant tannins, including hydrolysable and condensed varieties, are well known antioxidants in medicinal plants, foods, and edible fruits. Their diverse biological properties and potential for disease prevention have been demonstrated by various *in vitro* and *in vivo* assays. A number of ellagitannins, the largest group of hydrolysable tannins, have been isolated from dicotyledoneous angiosperms and characterized. This diverse class of tannins is sub-grouped into simple ellagitannins, C-glycosidic ellagitannins, complex tannins (condensates of C-glycosidic tannins with flavan-3-ol), and oligomers up to pentamers. This review outlines and describes the chemotaxonomic significance of structural features in various types of ellagitannins found in plants belonging to the Myrtaceae, Onagraceae, and Melastomataceae families, which are all included in the order Myrtales. Any biological activities that have been reported, including antitumor and antibacterial effects as well as enzyme inhibition, are also reviewed.

Keywords: ellagitannins; C-glycosidic ellagitannins; oligomeric ellagitannins; Myrtales; biological activity

1. Introduction

Plant tannins, one of the major groups of antioxidant polyphenols found in food and beverages, have attracted a lot of attention in recent years because of their multifunctional properties beneficial to human health. These diverse tannins may be divided into two large groups: condensed and hydrolysable. Condensed tannins are formed through the condensation of flavan-3-ols (catechins) and are often referred to as proanthocyanidins. Among the more than 500 hydrolysable tannins hitherto characterized, ellagitannins, which produce ellagic acid upon hydrolysis, constitute the largest group; the remaining group is gallotannins (galloylglucoses). The ellagitannins include: (1) monomeric ellagitannins, (2) *C*-glycosidic ellagitannins with an open-chain glucose core, (3) condensates of *C*-glycosidic tannins with flavan-3-ol (complex tannin), and (4) oligomers which are produced through intermolecular C-O or C-C bonds between monomers [1,2]. Unlike the condensed tannins that are widespread throughout the plant kingdom, ellagitannins have been found only in dicotyledonous angiosperms. Among the plant families rich in ellagitannins are the Myrtaceae, Lythraceae, Onagraceae, Melastomataceae, and Combretaceae [3]. These families belong to the order Myrtales according to the plant classification systems of New Engler, Cronquist, and APGII (angiosperm phylogeny group) [4]. Ellagitannins have also been isolated from plant species of Trapaceae and Punicaceae, which belong to Myrtales in Cronquist's and the New Engler's systems. This review outlines and describes the chemotaxonomic significance of structural features found in various types of ellagitannins, focusing on representative examples found in the plants of Myrtales. Any observed antioxidative and antitumor effects of these ellagitannins are also reviewed.

2. Monomeric Ellagitannins

2.1. Simple Ellagitannins

Ellagitannins are characterized by the presence of one or more hexahydroxydiphenoyl (HHDP) unit(s) on a glucopyranose core. The HHDP group is biosynthetically formed through intramolecular, oxidative C-C bond formation between neighboring galloyl groups in galloylglucoses [5]. They are easily hydrolysed, either enzymatically or with acid, to liberate a stable ellagic acid as the dilactone form of hexahydroxydiphenic acid. In addition to the HHDP group, other constituent acyl units in ellagitannins include a galloyl group and HHDP metabolites such as valoneoyl, dehydrohexahydroxydiphenoyl (DHHDP), and chebuloyl groups. Variations in the number and position of these acyl units on the glucose core provide a variety of analogs such as tellimagrandin I (1), and II (2), pedunculagin (6), casuarictin (7) [6], chebulagic acid (14), and chebulinic acid (15) [7] (Figure 1). Note that the chiral HHDP group at O-2/O-3 and O-4/O-6 of the glucose residue has an *S*-configuration, whereas that at O-3/O-6 has an *R*-configuration, as indicated by a positive and negative Cotton effect around 230 nm in their respective circular dichroism (CD) spectra [8].

Representative ellagitannin monomers thus far isolated from the Myrtaceae, Melastomataceae, Onagraceae, Trapaceae, Combretaceae, and Punicaceae families are summarized in Figure 1 and Table 1.

Figure 1. Structures of monomeric ellagitannins 1–15.

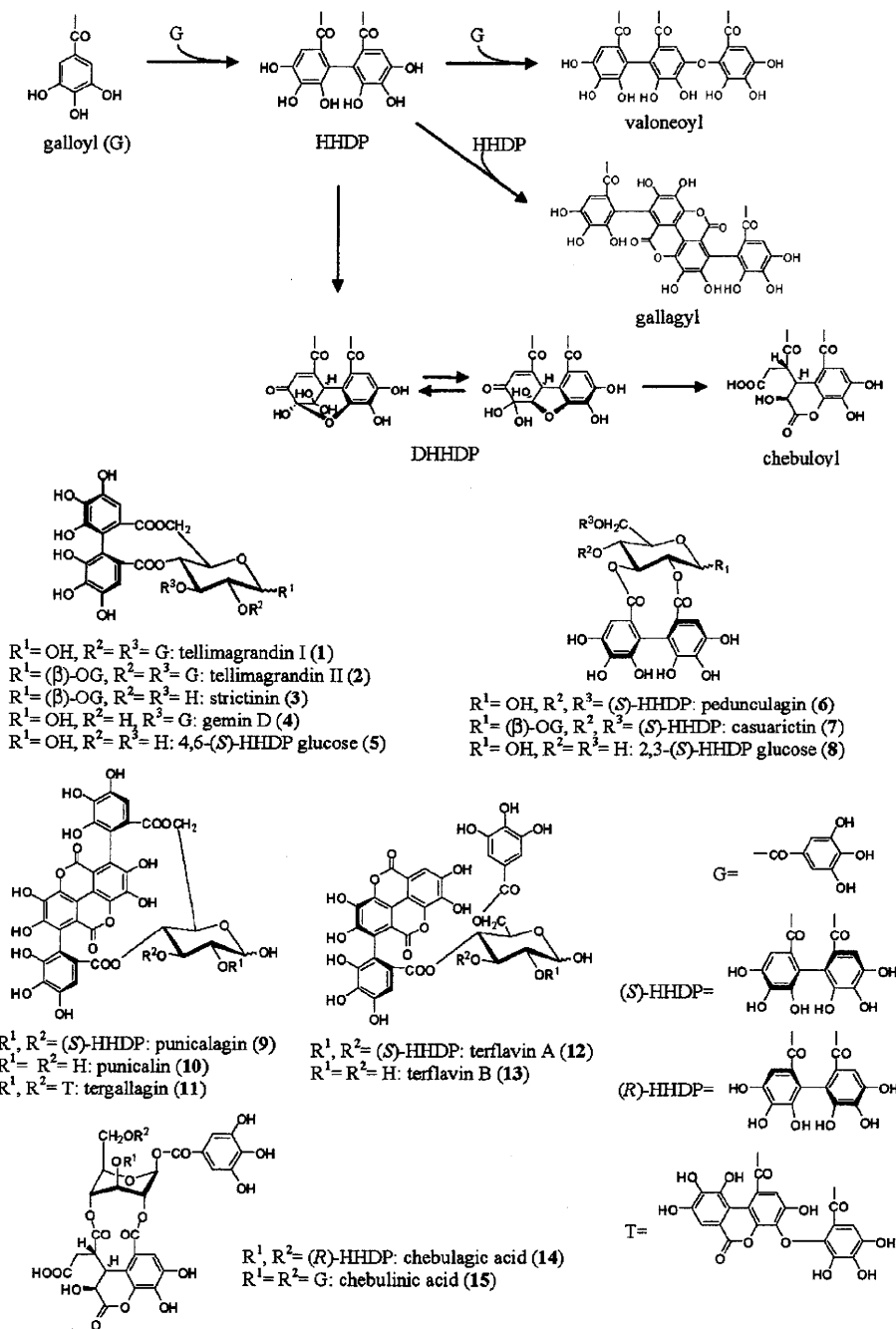


Table 1. Ellagitannin monomers found in the Myrtales.

Tannin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Plant source [Ref]															
Trapaceae															
<i>Trapa japonica</i> [9]	+			+		+	+								
Melastomataceae															
<i>Bredia tuberculata</i> [10]						+	+								
<i>Heterocentron roseum</i> [11]			+					+							
<i>Melastoma malabathricum</i> [12]			+					+	+						
<i>M. normale</i> [10]			+					+	+						
<i>Tibouchina semidecandra</i> [13]								+	+	+					
Myrtaceae															
<i>Callistemon lanceolatus</i> [14]				+		+				+					
<i>Eucalyptus alba</i> [15]	+			+		+				+					
<i>E. consideniana</i> [16]	+		+	+		+									
<i>E. globulus</i> [17]	+														
<i>E. rostrata</i> [18]	+														
<i>E. viminalis</i> [16]	+	+		+		+									
<i>Myrtus communis</i> [19]	+	+													
<i>Pimenta dioica</i> [20]		+	+		+	+									
<i>Syzygium aqueum</i> [21]		+				+			+						
<i>S. aromaticum</i> [22]	+	+	+	+					+						
Onagraceae															
<i>Epilobium angustifolium</i> [23]	+		+	+		+									
<i>Oenothera erythrosepala</i> [24]	+			+											
<i>O. laciniata</i> [25]	+														
<i>O. tetraptera</i> [26]	+	+		+											
Combretaceae															
<i>Combretum glutinosum</i> [27]									+	+	+				
<i>C. molle</i> [28]										+	+				
<i>Quisqualis indica</i> [29]	+	+				+			+	+	+				
<i>Terminalia arborea</i> [30]									+	+	+			+	+
<i>T. arjuna</i> [31]									+	+	+				
<i>T. brachystemma</i> [32]										+					
<i>T. calamansanai</i> [33]	+	+							+	+	+				
<i>T. catappa</i> [34]	+								+	+	+	+	+	+	+
<i>T. chebula</i> [35]										+	+		+	+	+
<i>T. citrina</i> [36]										+				+	
<i>T. macroptera</i> [37]									+	+		+	+		
<i>T. myriocarpa</i> [38]									+	+					
<i>T. triflora</i> [39]											+				
Punicaceae															
<i>Punica granatum</i> [40]	+		+			+			+	+	+				

Ellagitannins having a 4C_1 -glucopyranose core, e.g., 1–8, have been isolated along with gallotannins from various other plant families and show little chemotaxonomic significance. The considerably rare tannins punicalagin (9) and punicalin (10), both of which contain a gallagyl unit and were first isolated from the pericarps of pomegranate (*Punica granatum* Punicaceae) [40], were a characteristic component in some *Terminalia* species. This supports the hypothesis that Punicaceae is chemotaxonomically proximate to Combretaceae as classified by Cronquist and Engler. The punicalagin analogs tergalagin (11) and terflavins A (12) and B (13) were also isolated from *T. chebula* [35] and *T. catappa* [34].

Some *Terminalia* species produce ellagitannins with a 1C_4 -glucopyranose core and a unique chebuloyl group, such as chebulagic acid (14) and chebulinic acid (15). Although 14 and 15 have also been found in plants of the *Geranium* [41] and *Euphorbia* genera [42], their co-occurrence with 9 and/or 10 is a chemotaxonomic feature of *Terminalia*.

2.2. C-Glycosidic Ellagitannins

C-Glycosidic ellagitannins have been found in many plant families, including Lythraceae, Myrtaceae, Combretaceae, Melastomataceae, and Punicaceae, as well as Fagaceae, Betulaceae, Casuarinaceae, Rosaceae, Theaceae, and Elaeagnaceae [1]. They are categorized into two types: castalagin-type, which contain a flavogalloyl unit participating in the C-glycosidic linkage, such as castalagin (16) and its C-1 epimer, vescalagin (18), and casuarinin-type, which contain an HHDP unit, such as casuarinin (20) and stachyurin (21). In addition to these tannins, their metabolites, *i.e.*, grandinin (19), casuariin (22), and 5-desgalloylstachyurin (23), have been isolated from various plants of the Myrtales (Figure 2). *Lagerstroemia flos-reginea* and *L. speciosa* (Banaba) belonging to the family Lythraceae are particularly rich in C-glycosidic tannins including 16, 18, and 20–23 and casuarinin-type metabolites including punicacortein A (24) and lagerstroemin (29). Punicacortein A (24) and its analogs epi-punicacortein A (25) and punicacortein B (26)–D (28) were isolated from *Punica granatum*. Tannins 27 and 28, which both contain a gallagyl unit, were obtained together with punicalagin (9) from *Terminalia arborea* and *T. macroptera*, respectively.

The plant sources of C-glycosidic ellagitannins obtained from the order Myrtales are listed in Table 2.

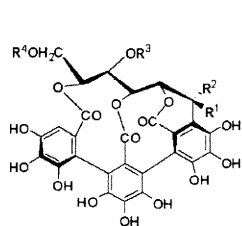
Table 2. C-Glycosidic ellagitannins in the order Myrtales.

Family	Plant species	C-Glycosidic tannins	Ref.
Combretaceae	<i>Anogeissus acuminata</i>	16, 17, 18, 19	[43]
	<i>Anogeissus leiocarpus</i>	16	[44]
	<i>Lumnitzera racemosa</i>	16	[45]
	<i>Terminalia arjuna</i>	16, 20, 22	[31]
	<i>Terminalia macroptera</i>	27	[37]
	<i>Terminalia arborea</i>	28	[30]
	<i>Thilao glaucocarpa</i>	16, 18, 20, 21	[46]
Lythraceae	<i>Lagerstroemia flos-reginea</i>	16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 29	[47]
	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	16, 18, 19, 29	[48]
Melastomataceae	<i>Osbeckia chinensis</i>	20, 22, 25	[49]
	<i>Tibouchina semidecandra</i>	16, 18, 20	[13]

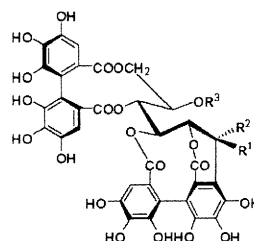
Table 2. Cont.

Myrtaceae	<i>Callistemon lanceolatus</i>	20	[14]
	<i>Eucalyptus alba</i>	21, 22	[15]
	<i>Eugenia grandis</i>	16, 18	[50]
	<i>Kunzea ambigua</i>	20	[51]
	<i>Melaleuca squarrosa</i>	20, 21	[52]
	<i>Pimenta dioica</i>	16, 18, 20, 22	[20]
	<i>Siphoneugena densiflora</i>	16, 20	[53]
	<i>Syzygium aqueum</i>	16, 18, 19	[21]
	<i>Syzygium aromaticum</i>	20, 22	[22]
Punicaceae	<i>Punica granatum</i>	20, 22, 25, 26, 27, 28	[40]
Trapaceae	<i>Trapa japonica</i>	20	[9]

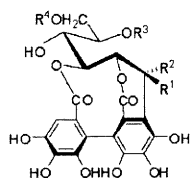
Figure 2. Structures of C-glycosidic ellagitannins 16–29.



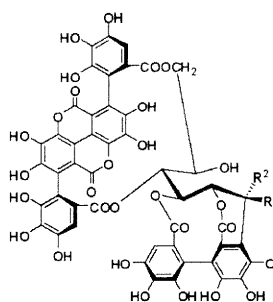
$R^1 = H, R^2 = OH, R^3, R^4 = (S)\text{-HHDP}$: castalagin (16)
 $R^1 = R^3 = R^4 = H, R^2 = OH$: castalin (17)
 $R^1 = OH, R^2 = H, R^3, R^4 = (S)\text{-HHDP}$: vescalagin (18)
 $R^1 = L, R^2 = H, R^3, R^4 = (S)\text{-HHDP}$: grandinin (19)



$R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = G$: casuarinin (20)
 $R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = G$: stachyurin (21)
 $R^1 = R^3 = H, R^2 = OH$: casuarinin (22)
 $R^1 = OH, R^2 = R^3 = H$: 5-desgalloylstachyurin (23)
 $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = Val$: lagerstroemin (29)



$R^1 = R^4 = H, R^2 = OH, R^3 = G$: punicaortein A (24)
 $R^1 = OH, R^2 = R^4 = H, R^3 = G$: epi-punicaortein A (25)
 $R^1 = R^3 = H, R^2 = OH, R^4 = G$: punicaortein B (26)



$R^1 = H, R^2 = OH$: punicaortein C (27)
 $R^1 = OH, R^2 = H$: punicaortein D (28)

