

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～ヒマワリ種子抽出物の成分解析～

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 ヒマワリ種子抽出物は既存添加物名簿に記載され、「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」と定義される酸化防止剤である。本研究では、本添加物2製品の逆相HPLCによる成分比較を行い、両製品ともchlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid及びcaffeic acidを主とするピークが観察され、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸は検出されなかった。また、酸化防止活性に寄与する活性本体を検討する目的で、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能を酸化防止活性の指標とし、分画した画分の活性評価と成分分析を行った。その結果、上述した成分に活性が認められ、本添加物活性への寄与が示された。一方で、これら成分を検出しない画分において強い活性が認められたことから、他の成分の活性も示唆された。本結果から、本添加物を確認する指標成分としては、明瞭に検出されるこれら3成分を指標とすることが考察される。

研究協力者

好村守生 松山大学薬学部 准教授

内倉 崇 松山大学薬学部 特任助教

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物 研究員

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物 研究員

加物協会発行の第4版既存添加物自主規格²⁾に記載され、イソクロロゲン酸、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、カフェー酸を検出する定量法が記載されているが、添加物自体の実データは乏しい。そこで、本研究では、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較について検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

A. 研究目的
ヒマワリ種子抽出物は、既存添加物名簿¹⁾に記載され、ヒマワリの種子から得られた、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸を主成分とする。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され、酸化防止剤を用途とする。本添加物は、日本食品添

加物協会発行の第4版既存添加物自主規格²⁾に記載され、イソクロロゲン酸、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、カフェー酸を検出する定量法が記載されているが、添加物自体の実データは乏しい。そこで、本研究では、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較について検討を行った。
ヒマワリ種子抽出物の添加物製品〔1（管理番号 C1089）、2（管理番号 C1090）〕は、日本食品添加物協会を通じて入手した。製品の外観は黄褐色の粉末（図1）であり、いずれもわずかににおいがある。標品として用いた chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid（図2）は長良サイエンス株式会社より入手したものをを用いた。試薬はすべて特級または HPLC 用を用いた。活性評価については、DPPH Antioxidant Assay Kit（同

人化学) を用いて測定した。

B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。測定条件を以下に記す。カラム: L-column ODS (2.1 i.d. × 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: 280 nm, 移動相: (A) 0.1% ぎ酸-蒸留水及び (B) 0.1vol% ぎ酸-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%→100%)].

NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し, 測定溶媒としてメタノール (MeOH) -d₄ を用いた。ケミカルシフトは溶媒由来ピーク [MeOH-d₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm)] を基準とした。高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用した。

B-3) 試料調製

各添加物試料について, 10 mg/mL になるよう蒸留水で溶解し, 試料溶液とした。調製した各試料溶液について, 逆相 HPLC 分析に供した。

B-4) 分画物の調製

ヒマワリ種子抽出物 (5.0 g) を水に溶解し, YMC gel ODS-AQ カラムクロマトグラフィーにより分画し, 7 画分 [①水溶出部 (1.1 g)、②10%MeOH 溶出部 (1.5 g)、③20%MeOH 溶出部 (1.6 g)、④30%MeOH 溶出部 (105.8 mg)、⑤40%MeOH 溶出部 (30.4mg)、⑥50%MeOH 溶出部 (8.2 mg)、⑦MeOH 溶出部 (17.0 mg)] を得た。

B-5) DPPH ラジカル消去活性の評価

酸化防止能の評価については, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を DPPH Antioxidant Assay Kit (同人化学) を用いて測定した。コントロールの吸光度に対する試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を算出し, 50%阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。また、

trolox の IC₅₀ を求め, TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) を算出した。

C. 結果及び考察

C-1) 分画物の逆相 HPLC 分析

前年度, 分析対象としたヒマワリ種子抽出物の有効成分とされるクロロゲン酸 [chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid)], イソクロロゲン酸 [di-*O*-caffeoylquinic acid 類 (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid)], 及び 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid を標品として HPLC 分析を行い, 保持時間 17, 19, 20 分付近に顕著なピークが共通して観察され, 3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid と同定し報告している。今年度は, 添加物試料を 7 画分 (①~⑦) に分画し, 各分画物について HPLC 分析を行った。その結果, 10%~30%MeOH (②~④) 溶出部に 3 成分によるピークが認められた。10%MeOH 溶出部 (②) について, カラムクロマトグラフィーによる分離精製を試みたところ 3-*O*-caffeoylquinic acid 及び 3 成分以外の caffeic acid を同定した。20%MeOH 溶出部 (③) については 3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 30%MeOH 溶出部 (④) については chlorogenic acid を同定した (図 3)。

C-2) DPPH ラジカル消去活性の評価

ヒマワリ種子抽出物より得られた分画物①~⑦について, DPPH ラジカル消去活性を評価した。また, 各分画物の添加物への寄与度を考察するため, 各分画物の TEAC を求めた。各分画物の活性 (IC₅₀ 及び TEAC) を表 1 に示す。IC₅₀, TEAC を見ると, 水溶出部以外は活性が認められたが, 特に分画物④~⑦が強い活性を示した。添加物における活性寄与度を検討するため, TEAC に収量を乗じて活性寄与値としてみると, 分画物③ (活性寄与度 42.1), ② (27.9), ④ (21.9) の順に大きいことが示された。よって, HPLC 分析の結果, 4 成分 (3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, caffeic acid) が認められた画分の寄与が示唆さ

れた。そこで、これら4成分のDPPHラジカル消去活性を評価したところ、3成分(3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid)はほぼ同等のDPPHラジカル消去活性を示し、いずれの化合物においても活性が認められた(表2)。それゆえ、これらcaffeoylquinic acid類が活性成分として示唆された。

一方で、収量が少ない分画物⑤～⑦についても強い活性が認められ、このフラクションには4化合物が殆ど検出されておらず、それゆえ、その他成分の活性への寄与も考察される。

D. 結論

既存添加物ヒマワリ種子抽出物について、添加物製品2検体の逆相HPLCによる成分比較を行った結果、両製品ともchlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid及びcaffeic acidによるピークが観察され、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸は検出されなかった。また、酸化防止活性に寄与する活性本体を検討する目的で、DPPHラジカル消去能を酸化防止活性の指標として分画した画分の活性評価と成分分析を行った。その結果、上述した成分に活性が認められ、本添加物活性への寄与が示された。一方で、これら成分を検出しない画分において強い活性が認められたことから、他の成分の活性も示唆された。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第120号(1996)“既存添加物名簿”平成8年4月16日
- 2) 第4版既存添加物自主規格, 平成20年10月, 日本食品添加物協会

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

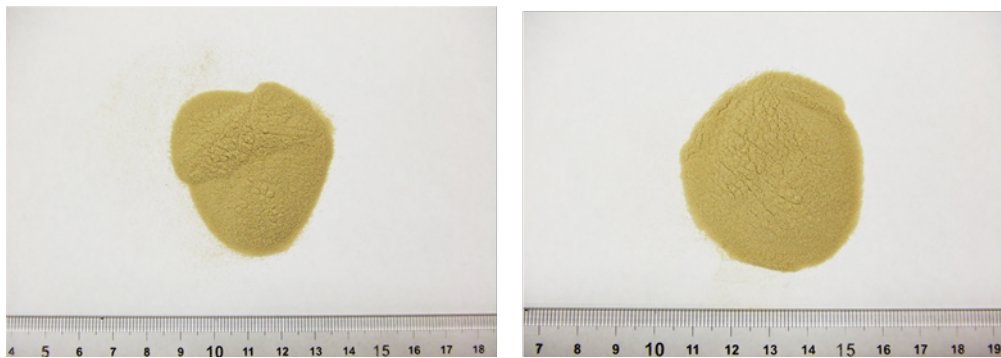
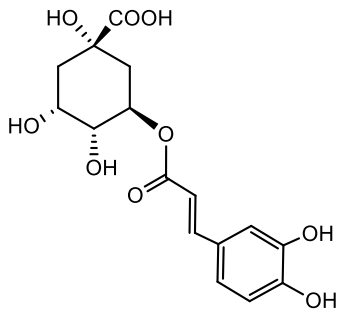
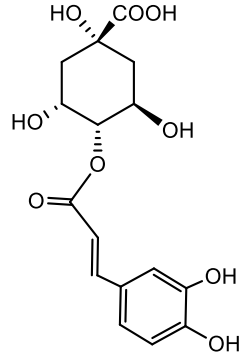


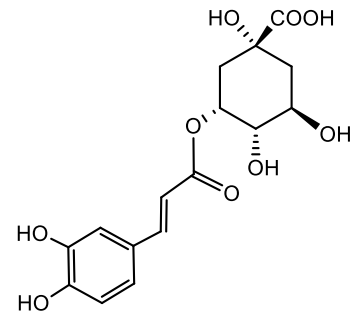
図1. ヒマワリ種子抽出物



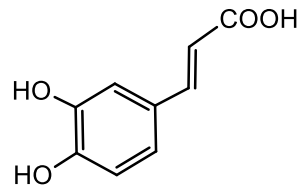
Chlorogenic acid



4-*O*-Caffeoylquinic acid



3-*O*-Caffeoylquinic acid



Caffeic acid

图 2. 構造式

表 1

ヒマワリ種子抽出物	IC ₅₀ : 2363.2 µg/mL TEAC : 0.0247
①YMC水溶出部	5000 µg/mL <
②YMC10%MeOH溶出部	3917.6 µg/mL 0.0186 (27.9)
③YMC20%MeOH溶出部	2483.9 µg/mL 0.0263 (42.1)
④YMC30%MeOH溶出部	297.6 µg/mL 0.207 (21.9)
⑤YMC40%MeOH溶出部	109.1 µg/mL 0.567 (17.2)
⑥YMC50%MeOH溶出部	280.2 µg/mL 0.216 (1.8)
⑦YMCMeOH溶出部	267.1 µg/mL 0.230 (3.9)

表 2

	IC ₅₀	TEAC
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	156.4 µM	1.55
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	146.4 µM	1.66
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	146.7 µM	1.62
Caffeic acid	688.8 µM	0.35