

研究要旨 ヒマワリ種子抽出物は既存添加物名簿に収載され、「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。これまで本研究では、添加物製品の逆相HPLCによる分析で主検出される3ピークについて成分の分離精製を行い、モノカフェオイルキナ酸類〔chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid)〕とともにcaffeic acidを単離、同定している。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) ラジカル消去活性を評価し、これら成分の活性への寄与を報告している。本年度は主検出ピーク以外の成分についてさらに成分精査を進め、新たにジカフェオイルキナ酸類 (3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid) を単離、同定した。また、文献未記載である2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acidユニットを含むカフェオイルキナ酸2種を単離、構造決定した。これら新たに単離した化合物を含め、DPPHラジカル消去活性を評価した結果、いずれも高い活性値を示し、活性への寄与が考察され、モノ及びジカフェオイルキナ酸が有効成分として示唆された。

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
食品添加物部 部長
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 主任研究員
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 主任研究員

A. 研究目的

ヒマワリ種子抽出物は、既存添加物名簿¹⁾に収載され、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5版既存添加物自主規格²⁾に収載され、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸の定量法が記載されているが、種子中にはネオクロロゲン酸やカフェー酸も含まれるとされ、実データに乏しい。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、添加物製品の成分解析について検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ヒマワリ種子抽出物の添加物製品〔1（管理番号 A1089）、2（管理番号 A1090）、3（管理番号 A2241）〕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 は長良サイエンス株式会社、3,4-di-*O*-

caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid は MedChemExpress, caffeic acid は東京化成より入手したものを用いた。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。カラムに L-column ODS (150 × 2.1 mm i.d., CERI) を使用し, 移動相に (A) 5% acetic acid, (B) acetonitrile で gradient: 0→30 min (B: 0→50%), 30→35 min (B: 50→85%), 35→40 min (B: 85%), 40→50 min (B: 85→100%) の溶出条件で, 流速 0.3 mL/min (40°C), 検出波長 280 nm で測定した。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 MeOH-*d*₄ を用いた。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) 試料調製及び分離精製

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。分離精製は, 試料 A2221 (100 g) を水に溶解し, Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより分画し, 3 画分 [① 水溶出部 (62.5 g), ② 30%MeOH 溶出部 (20.8 g), ③ MeOH 溶出部 (1.4 g)] を得た。MeOH 溶出部について, Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分 [④ 50%MeOH 溶出部 (976.7 mg), ⑤ 80%MeOH 溶出部 (546.4 mg), ⑥ 70% acetone 溶出部 (70.4 mg)] に分画し, カラムクロマトグラフィーに供した。

B-4) DPPH ラジカル消去活性の評価

酸化防止の評価については, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を DPPH Antioxidant Assay Kit 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 の IC₅₀/試料の IC₅₀) を算出した。

C. 結果及び考察

C-1) 分画物の逆相 HPLC 分析と分離精製

添加物 3 製品についてあらためて逆相 HPLC で分析した結果, 共通して主検出する 3 つのピークを確認した (図 2)。製品の一つについて, Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分 (①~③) に分画し, さらに③MeOH 溶出部について, Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分 (④~⑥) に分画した。分画のフローチャート及び各画分の HPLC クロマトグラムを図 3 に示す。成分精査を目的に, ②30%MeOH 溶出部について YMC GEL ODS カラムクロマトグラフィーを行った結果, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) 及び caffeic acid を単離, 同定した。さらに, ④~⑥について YMC GEL ODS カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返した結果, イソクロロゲン酸類 (3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid) とともに, 文献未記載の化合物 **1** 及び **2** を単離した。本研究において, 昨年度までの検討ではイソクロロゲン酸の含有が確認できていなかったが, HPLC における主検出ピーク以外のブロードピーク内を精査することで, それらの含有を確認することができた。各化合物の構造を図 4 に示す。

化合物 **1** は, 淡黄色無晶形粉末として得られ, 高分解能マスペクトルから, 分子式 C₂₆H₂₅NO₁₂ であることが示された。各種 NMR データを解析した結果, キナ酸及びカフェオイル基各 1 個に特徴的なシグナルが観察された。その他のシグナルをみると, 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid に特徴的なシグナル³⁾が観察された。HMBC スペクトルにより各ユニットの結合位置について確認した結果, キナ酸の 5 位にカフェオイル基, 3 位に 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合した構造であることが確認された。また, CD スペ

クトルの結果から 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットの 3 位は *S* 配置³⁾であると構造決定した。

化合物 **2** の NMR スペクトルデータは、化合物 **1** と同様に、キナ酸、カフェオイル基及び 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットに特徴的なシグナルが観察されたことから、これらを部分構造として構成される構造が推定された。各ユニットのつながりを明らかにするため、HMBC スペクトルを測定したところ、キナ酸の 5 位にカフェオイル基、4 位に 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合した構造であることが確認された。化合物 **1** と同様に、2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットの 3 位については、CD スペクトルの結果から *S* 配置であると構造決定した。

化合物 **1** 及び **2** のスペクトルデータを以下に示す。¹H 及び ¹³C-NMR スペクトルを図 5 及び 6 に記す。

化合物 **1** : 淡黄色無晶形粉末; UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 233 (4.23), 298 (4.13), 329 (4.20); $[\alpha]^{21}_{\text{D}} -23.0^\circ$ (c 0.002, MeOH); CD (MeOH) $[\theta]$ (nm): -5.3×10^4 (210), $+3.9 \times 10^4$ (237), -1.1×10^4 (262); HR-ESI-MS m/z : 542.1301 $[\text{M-H}]^-$ (calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{O}_{12}\text{N-H}$, 542.1304), 566.1266 $[\text{M+Na}]^+$ (calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{O}_{12}\text{N+Na}$, 566.1269); ¹H-NMR (500 MHz, MeOH- d_4): 7.51 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7'), 7.42 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-4''), 7.24 (1H, td, $J=7.5$, 1.5 Hz, H-6''), 7.03 (2H, m, H-2', 5''), 6.94 (1H, dd, $J=2$, 8 Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-7''), 6.76 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5'), 6.20 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8'), 5.24 (1H, m, H-5), 5.19 (1H, m, H-3), 3.82 (1H, dd, $J=3.5$, 7.5 Hz, H-4), 3.10 (2H, d, $J=3.5$ Hz), 1.90-2.12 (4H, m, H-2, 6). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH- d_4): 71.2 (C-1), 35.5, 37.4 (C-2, 6), 72.9 (C-3), 70.0 (C-4), 72.0 (C-5), 177.2 (C-7), 127.8 (C-1'), 115.2 (C-2'), 146.7 (C-3'), 149.6 (C-4'), 116.4 (C-5'), 123.1 (C-6'), 147.3 (C-7'), 115.0 (C-8'), 168.2 (C-9'), 180.8 (C-2''), 74.9 (C-3''), 125.5 (C-4''), 123.6 (C-5''), 130.9 (C-6''), 111.4 (C-7''), 143.2 (C-8''), 131.8 (C-9''), 42.8 (C-10''), 170.1 (C-11'').

化合物 **2** : 淡黄色無晶形粉末; UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 245 (4.10), 299 (4.09), 330 (4.18); $[\alpha]^{19}_{\text{D}}$

-18.5° (c 0.002, MeOH); CD (MeOH) $[\theta]$ (nm): -5.0×10^4 (210), $+2.9 \times 10^4$ (238), -7.8×10^3 (264); HR-ESI-MS m/z : 542.1312 $[\text{M-H}]^-$ (calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{O}_{12}\text{N-H}$, 542.1304), 566.1277 $[\text{M+Na}]^+$ (calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{O}_{12}\text{N+Na}$, 566.1269); ¹H-NMR (500 MHz, MeOH- d_4): 7.45 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7'), 7.37 (1H, d, $J=8$ Hz, H-4''), 7.19 (1H, td, $J=8$, 1.5 Hz, H-6''), 7.03 (1H, d, $J=2$ Hz, H-2'), 6.96 (1H, td, $J=8$, 1.5 Hz, H-5''), 6.93 (1H, dd, $J=2$, 8.5 Hz, H-6'), 6.84 (1H, d, $J=8$ Hz, H-7''), 6.77 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.12 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8'), 5.31 (1H, m, H-5), 4.91 (1H, dd, $J=3$, 9 Hz, H-4), 4.07 (1H, m, H-3), 3.14, 3.08 (1H, d, $J=16$ Hz, H-10), 1.90-2.20 (4H, m, H-2, 6). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH- d_4): 38.2, 39.1 (C-2, 6), 69.0, 68.9 (C-1, 3, 5), 75.6 (C-4), 177.0 (C-7), 127.7 (C-1'), 115.3 (C-2'), 146.7 (C-3'), 149.6 (C-4'), 116.5 (C-5'), 123.2 (C-6'), 147.4 (C-7'), 114.8 (C-8'), 168.0 (C-9'), 180.7 (C-2''), 74.9 (C-3''), 125.2 (C-4''), 123.6 (C-5''), 131.0 (C-6''), 111.4 (C-7''), 143.3 (C-8''), 131.6 (C-9''), 42.5 (C-10''), 169.9 (C-11'').

C-2) DPPH ラジカル消去活性の評価

本添加物の活性本体を検討する目的で、添加物 3 製品及び添加物の Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーによる分画物①～③の DPPH ラジカル消去活性について評価した。各分画物については、算出した TEAC 値に収量を乗じて全体の寄与度として求めた。結果を表 1 に示す。その結果、ヒマワリ種子抽出物の活性への寄与は、①H₂O 溶出部、②30%MeOH 溶出部が大きいことが示唆された。一方、③MeOH 溶出部の収量は少量であるが TEAC 値は高く、本画分も活性に寄与していることが考察された。①及び②画分の含有成分について HPLC の結果をみると、モノカフェオイルキナ酸類 [chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid] の含有が認められる。また、③画分からはジカフェオイルキナ酸 [イソクロロゲン酸: 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid] が単離された (図 4)。よって、これら化合物が活性へ寄与することが考察される。そこ

で単離同定した各化合物の DPPH ラジカル消去活性を評価した。その結果を表 2 に示す。モノカフェオイルキナ酸類は IC_{50} : 12.3~14.2 μM , ジカフェオイルキナ酸類は IC_{50} : 6.1~7.0 μM で、いずれも Trolox (IC_{50} : 24.1 μM) よりも強い活性を示し、caffeoyl 基の数により、活性が高くなる傾向が認められた。

化合物 1 及び 2 については、③画分から単離された。同様に、各化合物について DPPH ラジカル消去活性を評価した結果、化合物 1 は IC_{50} : 33.5 μM , 化合物 2 は 28.5 μM で、Trolox とほぼ同等の値を示し、これらも本添加物の有効成分の一つとして考察された。

D. 結論

既存添加物ヒマワリ種子抽出物の含有成分について精査した結果、共通して主検出する 3 成分が認められ、構造解析の結果、モノカフェオイルキナ酸類 (chlorogenic acid, 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid) と同定した。その他の成分についても精査した結果、ジカフェオイルキナ酸類 (イソクロロゲン酸類: 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid) を単離、同定した。また、文献未記載の化合物 2 種を単離し、化合物 1 はキナ酸の 5 位にカフェオイル基、3 位に 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合した構造と決定した。化合物 2 はキナ酸の 5 位にカフェオイル基、4 位に 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合したものと構造決定した。

活性に寄与する成分を明らかにするため、添加物試料溶液を分画し、DPPH ラジカル消去活性を指標に活性画分について検討した結果、主検出する 3 種のモノカフェオイルキナ酸類の寄与が示唆された。また、収量の少ない画分に認められる 3 種のジカフェオイルキナ酸類も高い活性値を示し、これら成分も活性への寄与が考察され、モノ及びジカフェオイルキナ酸が有効成分として示唆された。また、化合物 1 及び 2 は Trolox とほぼ同等の活性値を示し、本添加物の有効成分の一つとして考察された。

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 5 版既存添加物自主規格, 2021 年 4 月, 一般社団法人日本食品添加物協会
- 3) Li M., Tsoi B., Jin X-J., He R-R., Yao X-J., Dai Y., Kurihara H., Yao X-S.: Fitoterapia 99, 48-55 (2014)

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 天倉吉章, 内倉 崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の成分解析, 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.25~2023.3.28) (北海道)

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

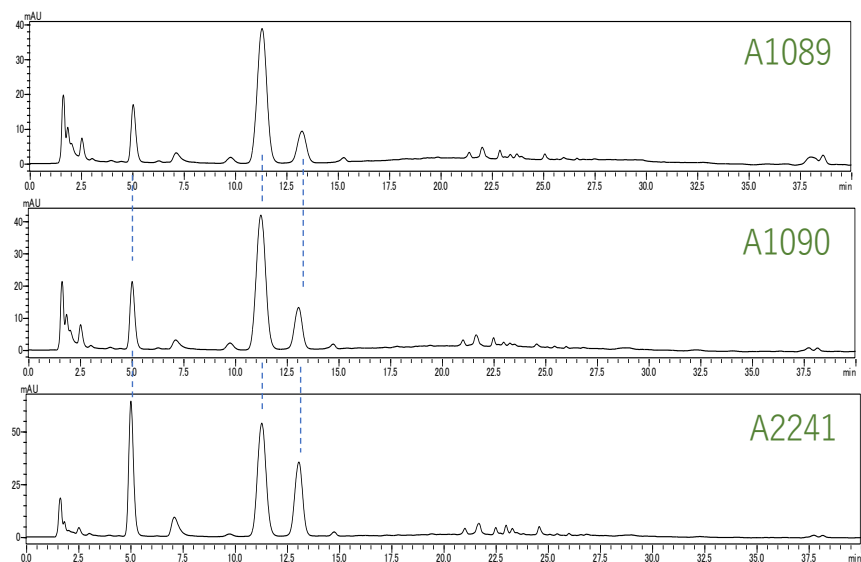


図 2. 添加物製品の HPLC クロマトグラム

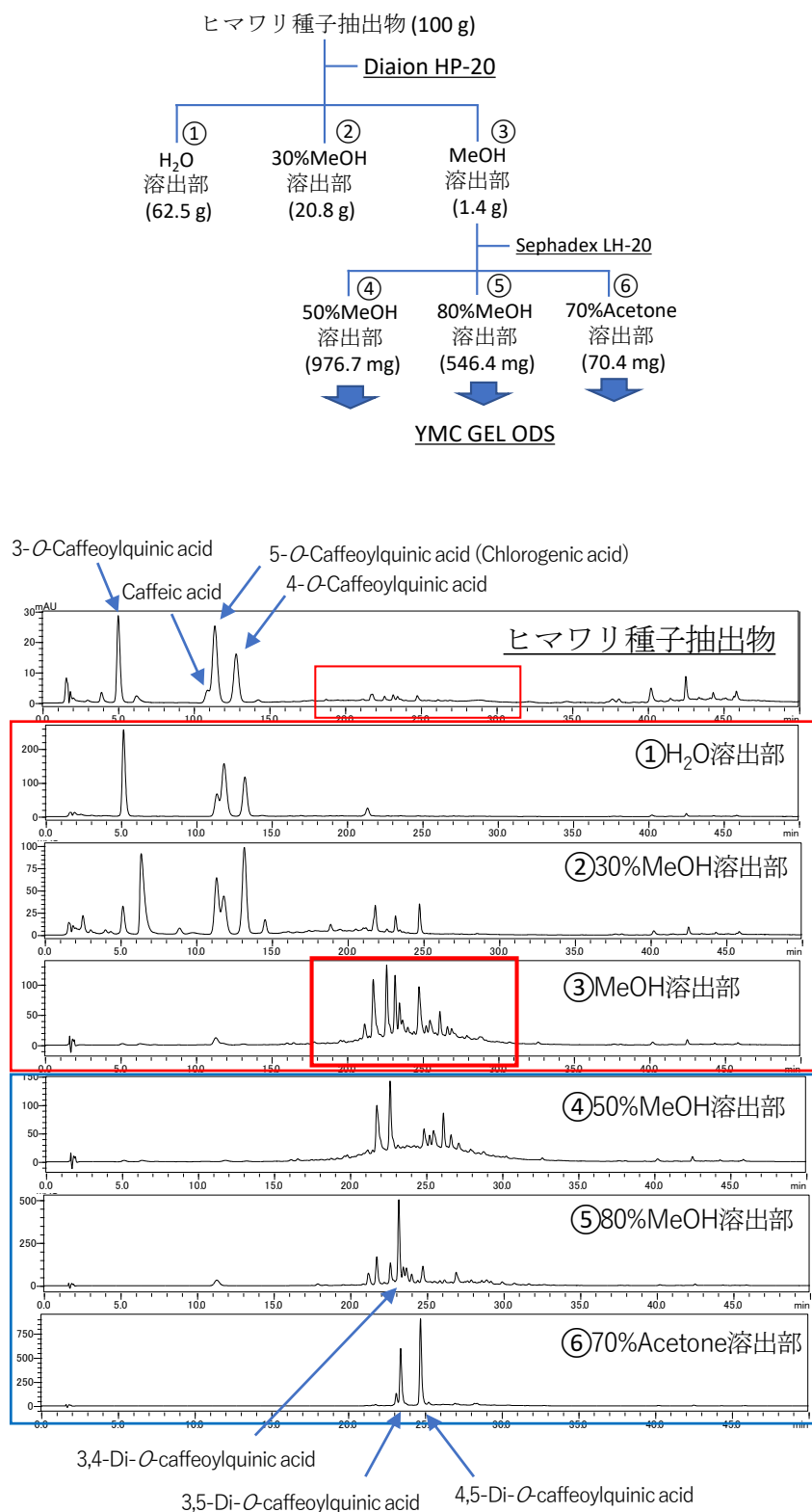
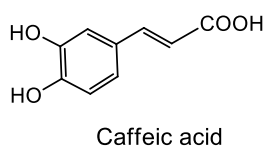
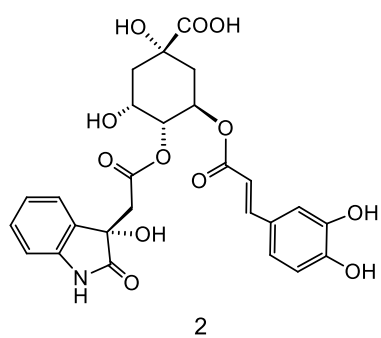
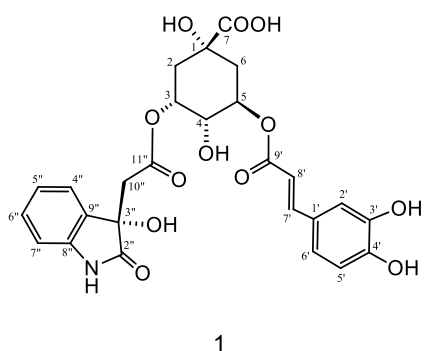
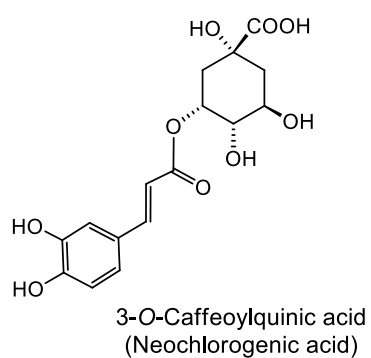
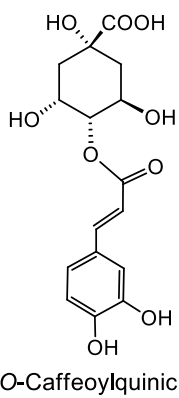
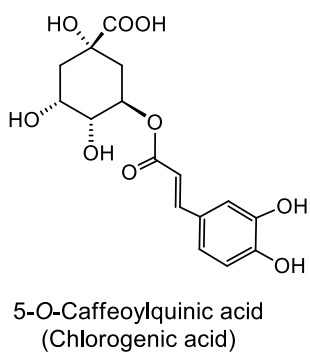


図 3. ヒマワリ種子抽出物の分画と各画分の HPLC クロマトグラム



□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □



□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □

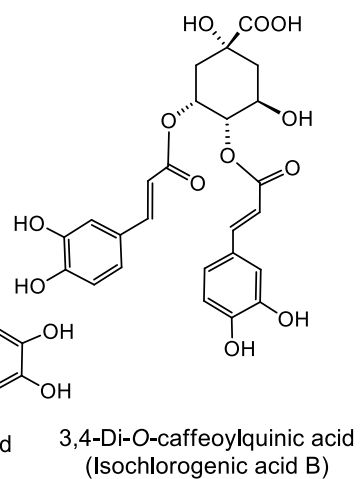
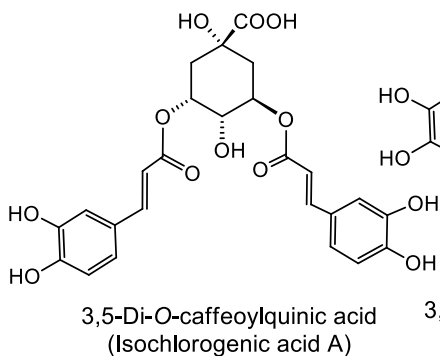
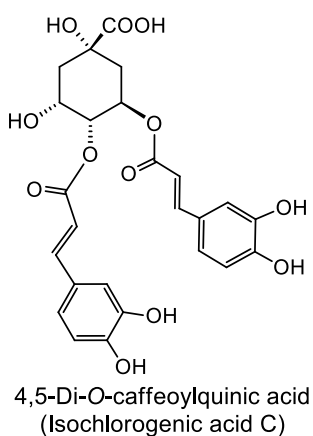


図 4. ヒマワリ種子抽出物含有成分の化学構造

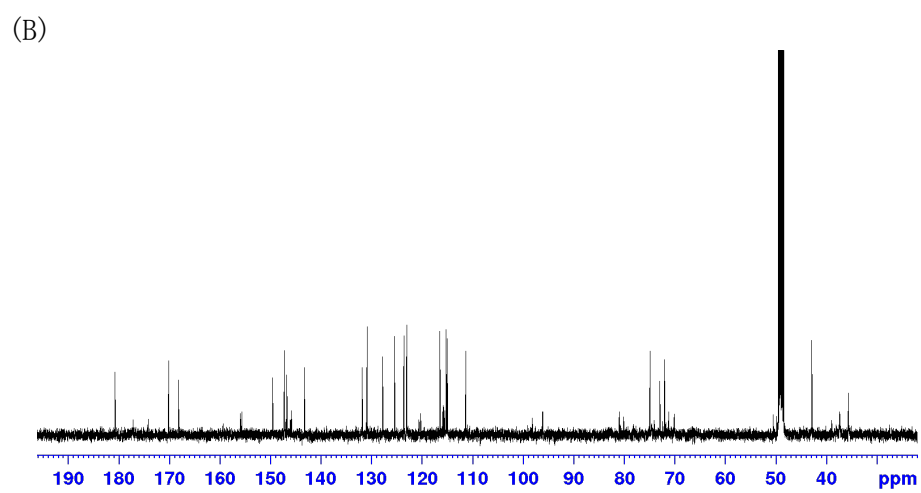
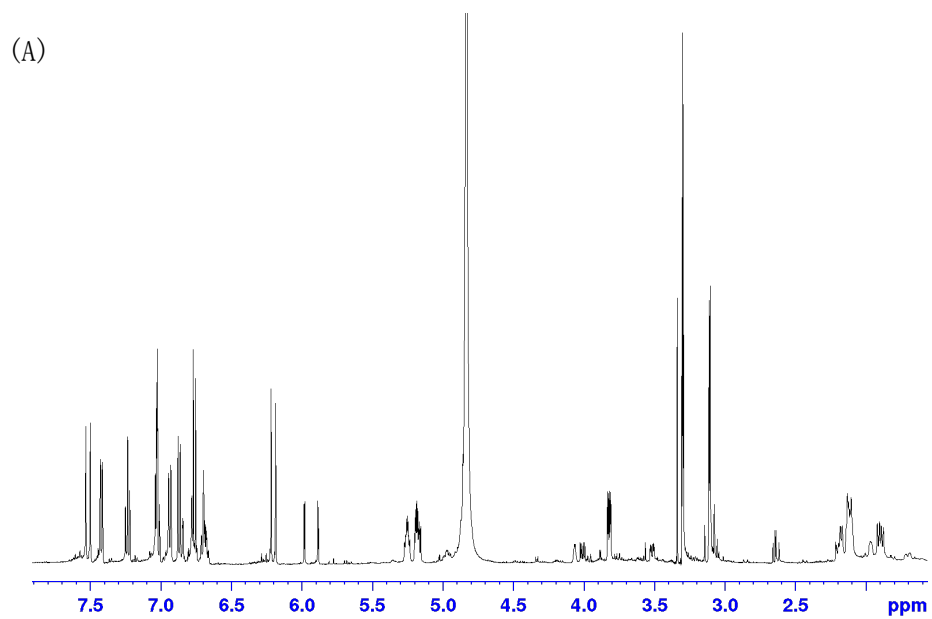


図 5. 化合物 1 の NMR スペクトル (MeOH- d_4)

(A) ^1H -NMR スペクトル (500 MHz), (B) ^{13}C -NMR スペクトル (126 MHz)

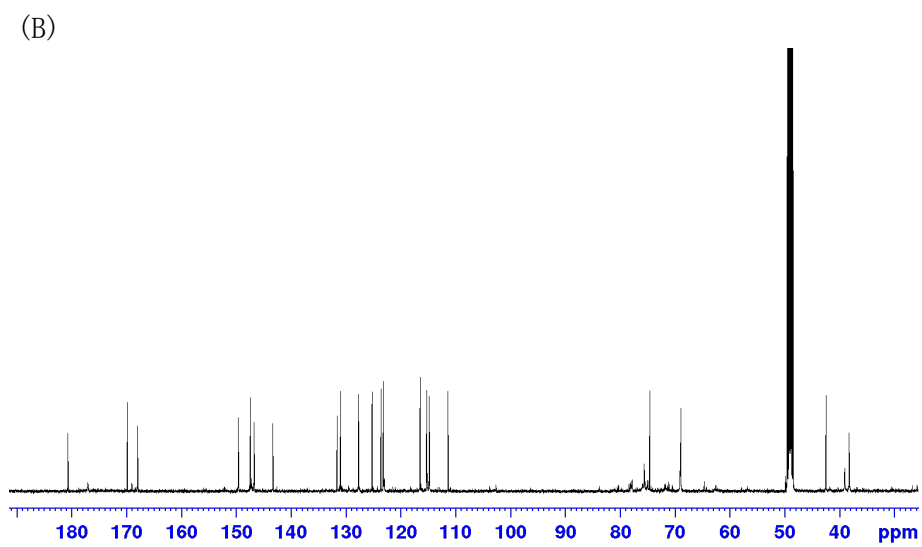
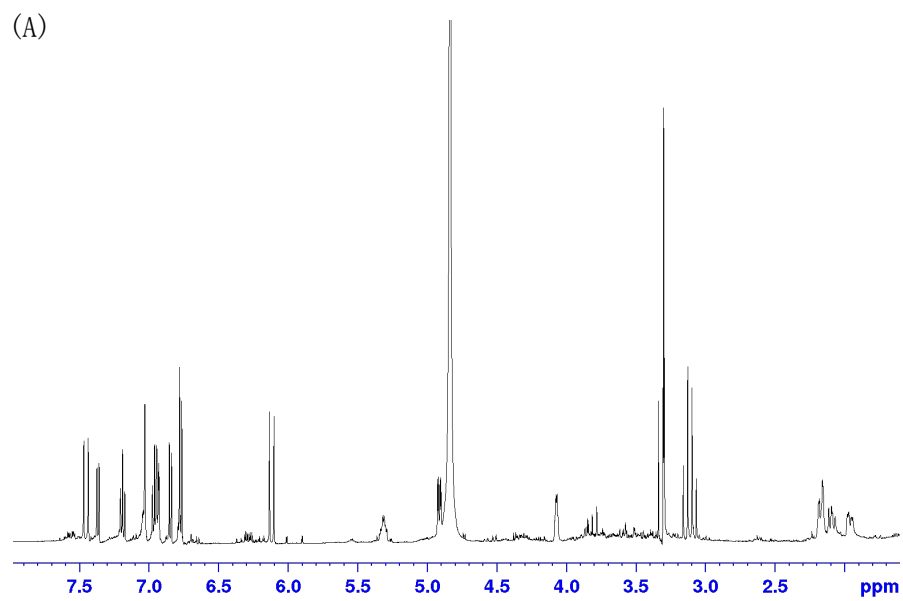


図 6. 化合物 2 の NMR スペクトル (MeOH- d_4)

(A) ^1H -NMR スペクトル (500 MHz), (B) ^{13}C -NMR スペクトル (126 MHz)

表 1

	IC ₅₀ (μ g/mL)	TEAC	収量 (寄与度)
添加物 (A1089)	229.5	0.028	
添加物 (A1090)	152.9	0.039	
添加物 (A2241)	136.4	0.047	
①H ₂ O溶出部	115.6	0.054	62.5 (3.38)
②30%MeOH溶出部	97.8	0.065	20.8 (1.35)
③MeOH溶出物	23.5	0.268	1.4 (0.38)

表 2

	IC ₅₀ (μ M)	TEAC
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	14.2	1.27
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	12.3	1.46
Chlorogenic acid	13.8	1.30
Caffeic acid	32.1	1.05
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	7.0	1.75
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	6.1	1.99
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	6.2	1.96