

研究要旨 本研究では、既存添加物の品質向上に資する研究、現状、成分規格が未設定であるヒマワリ種子抽出物を対象に、その成分規格（案）における確認試験法の確立および最適化に関する検討を行った。その結果、DPPHを用いた抽出物製品の抗酸化性を指標とした定量法では、試料採取量を変更することで、精油除去ウイキョウ抽出物（酸化防止剤）における確認試験法（案）で採用されている方法を準用可能であることが判明した。また、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸が含まれていることを確認するためのHPLC分析法については、確認試験法（案）で規定されている測定条件のうち、移動相の組成比を変更する必要があることが明らかとなった。なお、ヒマワリ種子抽出物1製品を分析したところ、有効成分とされているイソクロロゲン酸は検出されず、主要成分であるクロロゲン酸類およびカフェ酸の抗酸化性への寄与率は86.6%であることが判明した。

A. 研究目的

ヒマワリ種子抽出物は天然系の酸化防止剤として利用されている既存添加物であり、既存添加物名簿収載品目リスト注釈書では、基原・製法・本質において「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¹。現在、この添加物について、食品添加物公定書への収載へ向けて、成分規格や使用基準等の策定が進められている。そこで本研究では、規格試験法（確認試験法）の確立、最適化に向けた検討として、①DPPHを用いた抽出物製品の抗酸化性を指標とした定量法および②抽出物製品にイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸が含まれていることを確認するためのHPLC分析法に関する検討を実施した。さらに、ヒマワリ種子抽出物に含まれる主要成分を明らかにし、これらの成分のヒマワリ種子抽出物における抗酸化性への活性寄与率を求め、当該添加物の定義の適格性を評価した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ヒマワリ種子抽出物は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部よりご供与いただいた製品（Code：A1091, LOT：160223）を使用した。

5-*O*-カフェオイルキナ酸は東京化成工業製（Cat.No. C0181, Lot.LFDJC-BW）、3-*O*-カフェオイルキナ酸は東京化成工業製（Cat.No. N1155, Lot.CGLVE-Y2）、4-*O*-カフェオイルキナ酸は長良サイエンス株式会社製（Code.NS430202, Lot.0002）、カフェ酸は富士フィルム和光純薬工業製（Cat.No. 040-20982, Lot.SDE2297）を使用した。1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は富士フィルム和光純薬工業製（Cat.No. 047-04051, Lot.KWM6401）を使用した。6-Hydroxy-2,5,7,8-tetrathylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は東京化成工業製（Cat.No. H0726, Lot.CYPYL-JS）を使用した。重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆) は、Eurisotop社製を使用した。

その他の溶媒は、高速液体クロマトグラフィー用または特級を用いた。

B-2) 装置

核磁気共鳴装置 (NMR) : ECA500 (プロトン共鳴周波数 : 500 MHz) (日本電子 (株) 製)

分析用 HPLC ポンプ : LC-10AD_{VP} (低压グラジエントユニット内蔵), オートサンプラ : SIL-10AP, カラム恒温槽 : CTO-10AS_{VP}, 紫外可視分光検出器 : SPD-10A_{VP}, システムコントローラ : CBM-20A, 分析データ処理システム : LabSolutions (以上 (株) 島津製作所製), 脱気装置 : AG-34 ((株) フロム製).

マイクロ天秤 : BM-20 ((株) エー・アンド・デイ製)

セミマイクロ天秤 : AUW220D および AP125WD ((株) 島津製作所製)

B-3) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性に関する検討

DPPH ラジカル消去活性は, 精油除去ウイキョウ抽出物 (用途 : 酸化防止剤) の成分規格 (案) にて示されている方法に準じて行った.

B-3-1) DPPH 溶液の調製

DPPH 17 mg を秤量し, エタノール (99.5) に溶解後, 200 mL に定容したものを DPPH 溶液とした (濃度 : 0.2 mmol/L). DPPH 溶液は, 調製直後から 1 時間程度までは時間とともに吸光度が低下することが知られている. そこで, 遮光して 2 時間放置し, 吸光度が安定してから DPPH ラジカル消去活性の測定に使用した.

B-3-2) DPPH ラジカル消去率の算出

ヒマワリ種子抽出物 10, 20, 30, 40 および 50 mg をそれぞれ精密に量りとり, 水を加えて 20 mL としたものを試料溶液①~⑤ (濃度 : 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/mL) とした. なお, これら試料溶液は, 1 濃度あたり 3 併行で作製した. 調製された各試料溶液 0.5 mL を試験管に入れ, 100 mM Tris-HCl buffer

(pH7.4) 2.0 mL を加えて混合した. DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 2.5 mL を加え, 直ちに攪拌し

た後, 暗所に 30 分間放置したものを試験溶液とし, 吸光度 (波長 : 517 nm) を測定した.

試料溶液添加時の吸光度を A_s , 試料溶液の代わりにエタノール (99.5) を添加した際の吸光度を A_c とし, 次の計算式からヒマワリ種子抽出物試料溶液の各濃度における DPPH ラジカル消去率 (%) を求めた.

DPPH ラジカル消去率 (%)

$$= \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

B-3-3) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性 (IC_{50}) の算出

1 つの標準液群 (濃度 : 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 および 2.5 mg/mL) の各試料濃度 (x) に対する DPPH ラジカル消去率 (y) をプロットし, 回帰直線 ($y = ax + b$) を作成した. これらを標準液群ごと (計 3 種) に作成し, 得られた各回帰式の y に 50 を代入したときの x (試料濃度) の平均値を DPPH ラジカル消去活性 (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) とした.

B-4) HPLC による確認試験法の確立に向けたヒマワリ種子抽出物分析における測定条件の検討

ヒマワリ種子抽出物の成分規格 (案) に示されている方法に準じて行った. すなわち, ヒマワリ種子抽出物 10 mg を精密に量り, 0.1% ギ酸を加え, 溶解し, 1 mL に定容したものを試験溶液とした (濃度 : 10 mg/mL). この試験溶液を以下に示す条件で HPLC 分析を行った.

【HPLC 条件】

カラム : ナカライテスク (株) 製 COSMOSIL 5C18-MS-II, ナカライテスク (株) 製 COSMOSIL 5C18-AR-II, 関東化学 (株) 製 Separar C18G, STAR 製 Mightysil RP-18 GPII (すべて内径 : 4.6 mm, 長さ : 250 mm, 粒子径 : 5 μm), 移動相 : 0.1% ギ酸/メタノール = 75/25, 流速 : 1.0 mL/min, カラム温度 : 40°C, 検出波長 : 320 nm, 注入量 : 10 μL

B-5) ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率の検討

ヒマワリ種子抽出物の抗酸化性に対する中の主要な含有成分（クロロゲン酸，カフェ酸，4-O-カフェオイルキナ酸，3-O-カフェオイルキナ酸）の寄与率を算出するため，「4成分およびヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性」，「4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性（TEAC）」および「ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量（%）」をそれぞれ求めた。

B-5-1) ヒマワリ種子抽出物中の各主要成分の含量（%）

B-5-1-1) ヒマワリ種子抽出物の試験溶液の調製

ヒマワリ種子抽出物 10 mg を精密に量り，0.1%ギ酸を加え，溶解し，10 mL に定容したものを試験溶液とした（濃度：1 mg/mL）。

B-5-1-2) クロロゲン酸検量線用標準溶液の調製

本化合物を精密に量りとり，0.1%ギ酸で完全に溶解したものを検量線用標準溶液①とした（濃度：200 µg/mL，濃度は¹H-qNMRに基づく）。この溶液を公比 2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し，検量線用標準溶液②～⑤とした（濃度：100，50，25，12.5 µg/mL）。

B-5-1-3) カフェ酸検量線用標準溶液の調製

本化合物を精密に量りとり，10%メタノールで完全に溶解したものを検量線用標準溶液①とした（濃度：120 µg/mL，濃度は¹H-qNMRに基づく）。この溶液を公比 2 で 10%メタノールを用いて希釈し，検量線用標準溶液②～⑤とした（濃度：60，30，15，7.5 µg/mL）。

B-5-1-4) 3-O-カフェオイルキナ酸検量線用標準溶液の調製

¹H-qNMR により濃度を求めた標準原液（50 mg/mL in DMSO-*d*₆）を 40 µL 採り，0.1%ギ酸を加え 10 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした（濃度：200 µg/mL）。この溶液を公比

2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し，検量線用標準溶液②～⑤とした（濃度：100，50，25，12.5 µg/mL）。

B-5-1-5) 4-O-カフェオイルキナ酸検量線用標準溶液の調製

¹H-qNMR により濃度を求めた標準原液（5 mg/mL in DMSO-*d*₆）を 80 µL 採り，0.1%ギ酸を加え 2 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした（濃度：200 µg/mL）。この溶液を公比 2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し，検量線用標準溶液②～⑤とした（濃度：100，50，25，12.5 µg/mL）。

B-5-1-6) ヒマワリ種子抽出物中の各主要成分の含量（mg/g）の算出

得られたヒマワリ種子抽出物中の各主要成分のピーク面積を，該当する標準溶液の検量線式に代入し試験溶液中の濃度（C）を求め，以下の計算式からヒマワリ種子抽出物中の各主要の含量（mg/g）を求めた

各主要成分の含量（mg/g）

$$= \frac{C \times V}{W}$$

C: 試験溶液の指標成分の濃度（µg/mL）

V: 試験溶液の液量（mL）

W: ヒマワリ種子抽出物の秤取量（mg）

B-5-2) ヒマワリ種子抽出物および各指標成分の DPPH ラジカル消去活性

DPPH 溶液の調製は B-3-1，ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去率の算出（%）は B-3-2 に示す手順でそれぞれ行った。

B-5-2-1) 各主要成分の DPPH ラジカル消去率の算出（%）

クロロゲン酸は，当該化合物 10 mg を精密に量り，0.1%ギ酸を加えて 50 mL としたもの（200 µg/mL）から希釈し，試料溶液①～④（濃度：5，10，20，40 µg/mL）とした。これらの溶液は定量用試薬の¹H-qNMRの結果に基づき調製した。

カフェ酸では，試薬の¹H-qNMRの結果に基

づき当該化合物を精密に量り、10%メタノールを加えて完全に溶解したもの（濃度：120 µg/mL）から希釈し、試料溶液①～④（濃度：3, 6, 12, 24 µg/mL）とした。

3-*O*-カフェオイルキナ酸では、¹H-qNMR 用試験溶液（50 mg/mL in DMSO-*d*₆）を 20 µL 採り、0.1%ギ酸を加え 5 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした（濃度：200 µg/mL）から希釈し、試料溶液①～④（濃度：10, 20, 40, 50 µg/mL）とした。

4-*O*-カフェオイルキナ酸では、¹H-qNMR 用試験溶液（5 mg/mL in DMSO-*d*₆）を 80 µL 採り、0.1%ギ酸を加え 2 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした（濃度：200 µg/mL）から希釈し、試料溶液①～④（濃度：10, 20, 40, 50 µg/mL）とした。

トロロックスでは、本化合物 20mg を正確に量り、エタノール（99.5）を加えて 100 mL としたもの（200µg/mL）から希釈し、試料溶液①～⑤（濃度：25, 50, 80, 100µg/mL）とした。

なお、各化合物の試料溶液は、1 濃度あたり 3 併行で調製した。調製された各試料溶液 0.5 mL を試験管に入れ、100 mM Tris-HCl buffer

（pH7.4）2.0 mL を加えて混合した。DPPH 試液（0.2 mmol/L）2.5 mL を加え、直ちに攪拌した後、暗所に 30 分間放置したものを試験溶液とし、吸光度（波長：517 nm）を測定した。

試料溶液添加時の吸光度を *A*_s、試料溶液の代わりにエタノール（99.5）を添加した際の吸光度を *A*_c とし、B-3-2 で示した計算式から各試料溶液の濃度毎の DPPH ラジカル消去率（%）を求めた。

B-5-2-2) DPPH ラジカル消去活性 (IC₅₀) の算出

B-5-2-1 で調製した各化合物およびヒマワリ種子抽出物の試料溶液を用い、B-3-3 と同様の方法により DPPH ラジカル消去活性 (IC₅₀, µg/mL) を求めた。

B-5-2-3) トロロックス等価活性 (TEAC) の算出

文献報告に従い、次の計算式から、各主要成分の TEAC をそれぞれ求めた。

各主要成分の TEAC (µgTE/µg)

$$= \frac{\text{トロロックスの IC}_{50}}{\text{測定対象の IC}_{50}}$$

B-5-3) 各主要成分のヒマワリ種子抽出物の抗酸化性に対する寄与率の算出

B-5-1 および B-5-2 で求められた各データに基づき、次の式により各成分の寄与率をそれぞれ算出した。

寄与率 (%)

$$= \frac{\text{成分の TEAC} \times \text{抽出物中の含量 (\%)}}{\text{ヒマワリ種子抽出物の TEAC}}$$

C. 結果及び考察

C-1) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性に関する検討

ヒマワリ種子抽出物の成分規格（案）における確認試験法として、精油除去ウイキョウ抽出物（酸化防止剤）における確認試験法（案）で採用されている DPPH 法を参考に、その適用性を検討した。

まず、各種濃度のヒマワリ種子抽出物試験溶液（濃度：0.5, 1.0, 1.5, 2.0 および 2.5 mg/mL）を用いて、DPPH 法の測定手順および直線性を評価した。その結果、図 1 に示すように、ヒマワリ種子抽出物の検討した試験溶液の濃度において、濃度とその DPPH ラジカル消去活性には良好な直線性が認められ（決定係数：0.9975）、検討した濃度範囲であれば、DPPH ラジカル消去活性を適切に評価できることが明らかとなった。なお、この回帰直線から求められる DPPH ラジカル消去活性 (IC₅₀) は、約 2 mg/mL であることが確認された。確認試験法を規定する場合、活性値がおおよそ 50% となる濃度を試験溶液濃度とすると、今回のヒマワリ種子抽出物製品の結果より、測定で用いる試料の秤取量は 40 mg（40 mg（秤量

値) /20 mL (試料溶液量) が適切と考えられた。

C-2) HPLCによる確認試験法の確立に向けたヒマワリ種子抽出物分析における測定条件の検討

次に、ヒマワリ種子抽出物の成分規格(案)において、指標成分が当該添加物に含まれていることを確認するために、HPLCを用いた確認試験法が規定される予定である。そこで、この確認試験法(案)で規定されている測定条件の適用性を評価するため、4種のカラムを使用してヒマワリ種子抽出物製品を分析した。その結果、図2に示すように、5分以降に溶出される主要な4種のピークが確認された。ただし、2種のカラム(Seprarar C18GおよびMightysil RP-18 GP II)において、ピーク2および3の分離度が0.75以下であることが確認された。そこで、移動相(0.1%ギ酸/メタノール)の組成比を75/25から80/20に変更し再度分析を行った。その結果、図3に示すようにすべてのカラムにおいて、ピーク2および3の分離度が1.5以上であり、またヒマワリ種子抽出物に含まれる主要な4成分すべてが良好に分離されることが確認された。以上の結果より、確認試験法(案)で示されている測定条件のうち、移動相(0.1%ギ酸/メタノール)の組成比を75/25から80/20へ変更する必要があると考えられた。

C-3) ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率の検討

次に、ヒマワリ種子抽出物の成分規格(案)と実試料の整合性やヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率^{2,3}を明らかにするための検討を行った。

まず、B-5-1-1に示すヒマワリ種子抽出物試験溶液について、C-2で示す0.1%ギ酸/メタノール=80/20を移動相とするHPLC条件を用いて分析したところ、図4に示すようにクロマトグラムが得られ、定量用標品との直接比較により、ピーク1が3-O-カフェオイルキナ酸、ピーク2がクロロゲン酸、ピーク3が4-O-カフェオイルキナ酸、ピーク4がカフェ酸であることが確認された。なお、保持時間3

分のピークについては測定の度に面積値が大きく変動することから、単一の成分ではない可能性があると考えられた。また、成分規格(案)で示されているイソクロロゲン酸については、当該試料では検出されなかった。

そこで、これら4成分を対象に、ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する寄与率を求めるとした。寄与率の算出に当たり、①4成分およびヒマワリ種子抽出物のDPPHラジカル消去活性、②4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性(TEAC)および③ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量(%)について検討を行った。4成分およびヒマワリ種子抽出物のDPPHラジカル消去活性を図5および表1に、4成分の検量線を図6に、4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性(TEAC)を表2、ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量(%)を表3にそれぞれ示した。そこでこれらの結果に基づいて、ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要な4種の成分の寄与率を求めたところ、含量の多い順にクロロゲン酸は41.2%、4-O-カフェオイルキナ酸は18.8%、3-O-カフェオイルキナ酸は16.8%、カフェ酸は9.8%であることが判明し、これら4種の寄与率の合計は86.6%であった。

D. 結論

本研究では、既存添加物の成分規格(案)の最適化を目指して、ヒマワリ種子抽出物を対象に検討を行った。その結果、DPPHラジカル消去活性を指標とする確認試験法においては、精油除去ウイキョウ抽出物の成分規格(案)で示されている方法をおおよそ準用可能ではあるが、試料秤取量は40 mgが適切と考えられた。また、HPLCによる確認試験法においては、ヒマワリ種子抽出物の成分規格(案)で示されているHPLC条件のうち、移動相を0.1%ギ酸/メタノール=80/20へ変更する必要があると考えられた。さらに、食品添加物製品1種の分析を行ったところ、主要成分はクロロゲン酸、4-O-カフェオイルキナ酸、3-O-カフェオイルキナ酸およびカフェ酸であることが判明し、これらの抽出物の抗酸化性に対する寄与率は86.6%であるこ

とが明らかとなった。今回はヒマワリ種子抽出物 1 製品のみでの検討ではあるものの、成分規格（案）に示されているイソクロロゲン酸類は検出されなかったこと、一方でカフェ酸が検出され、この化合物も抗酸化性に寄与することから、今後、他の製品についても検討を行い、成分規格（案）の記載の最適化を進めていく必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書, 日本食品添加物協会技術委員会 (1999)
- 2) Matsufuji T, Chino M, Yamagata K, Yamazaki T. Antioxidant compounds and their contribution to total antioxidant capacity in rosemary extracts, natural antioxidants. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **2010**; *17*: 164-170.
- 3) Shimamura T, Ito Y, Kubo Y, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Yamazaki T, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H. Relationship between catechin content and antioxidant capacity in natural food additive tea extract. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*,

2017; *24*: 10-15.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた **Single-reference HPLC** 法による健康食品中のアントシアニンの定量について, 日本食品科学工学会第 69 回大会, 2022 年 8 月
- 2) 黄奕, 大槻崇, 森川悟, 松藤寛, 治療薬物モニタリング (薬物濃度測定) における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用, 第 4 回日本定量 NMR 研究会年会, 2022 年 12 月
- 3) 岡庭寛昂, 池上美音, 宮下采佳, 大槻崇, 松藤寛, 長田和実, 中西祐輔, 高橋恭子, 酪酸が腸管上皮バリアへ与える影響, 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月

2. 論文発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

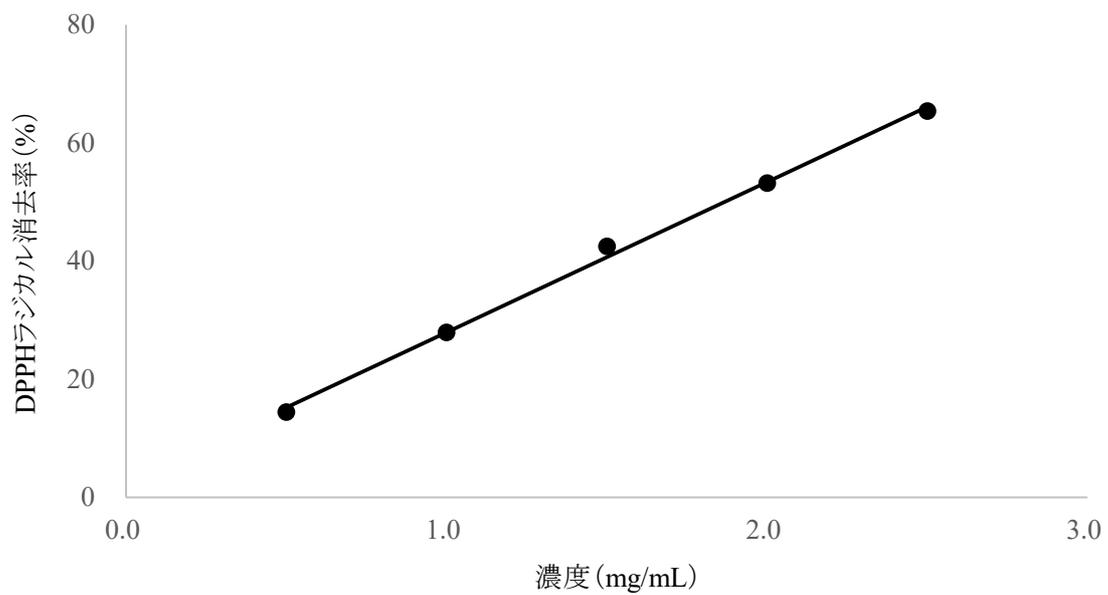


図1 ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去率

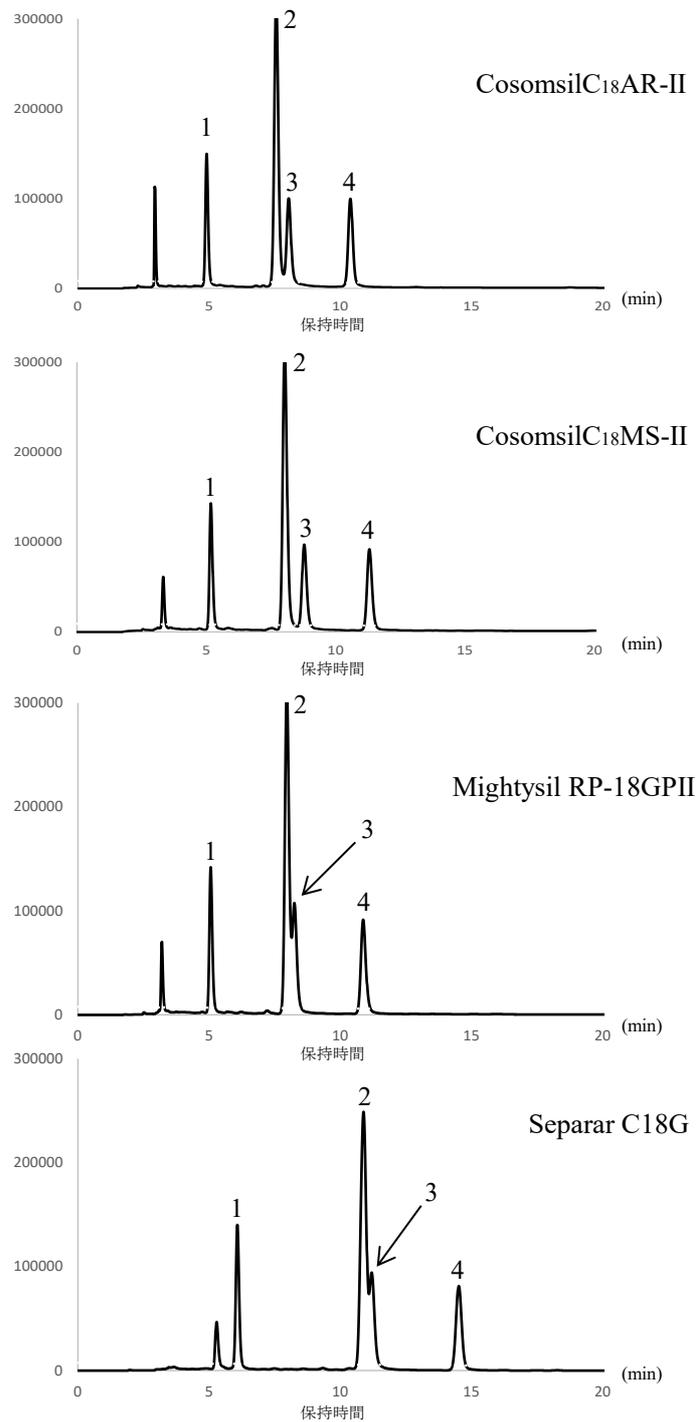


図2 各種カラムにおけるヒマワリ種子抽出物製品のクロマトグラム

HPLC 条件

移動相：0.1%ギ酸/メタノール=75/25，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40℃，検出波長：320 nm，注入量：10 μ L

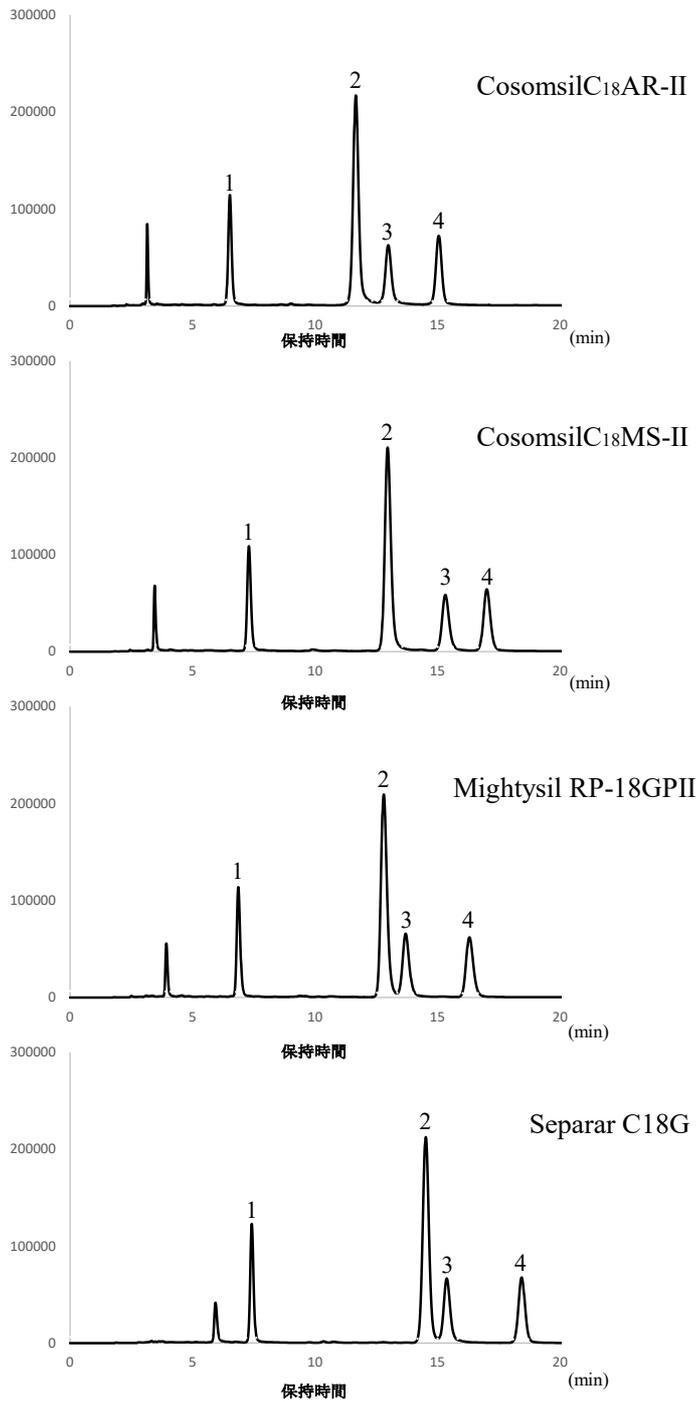


図3 各種カラムにおけるヒマワリ種子抽出物製品のクロマトグラム

HPLC 条件

移動相：0.1%ギ酸/メタノール=80/20，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40℃，検出波長：320 nm，注入量：10 μL

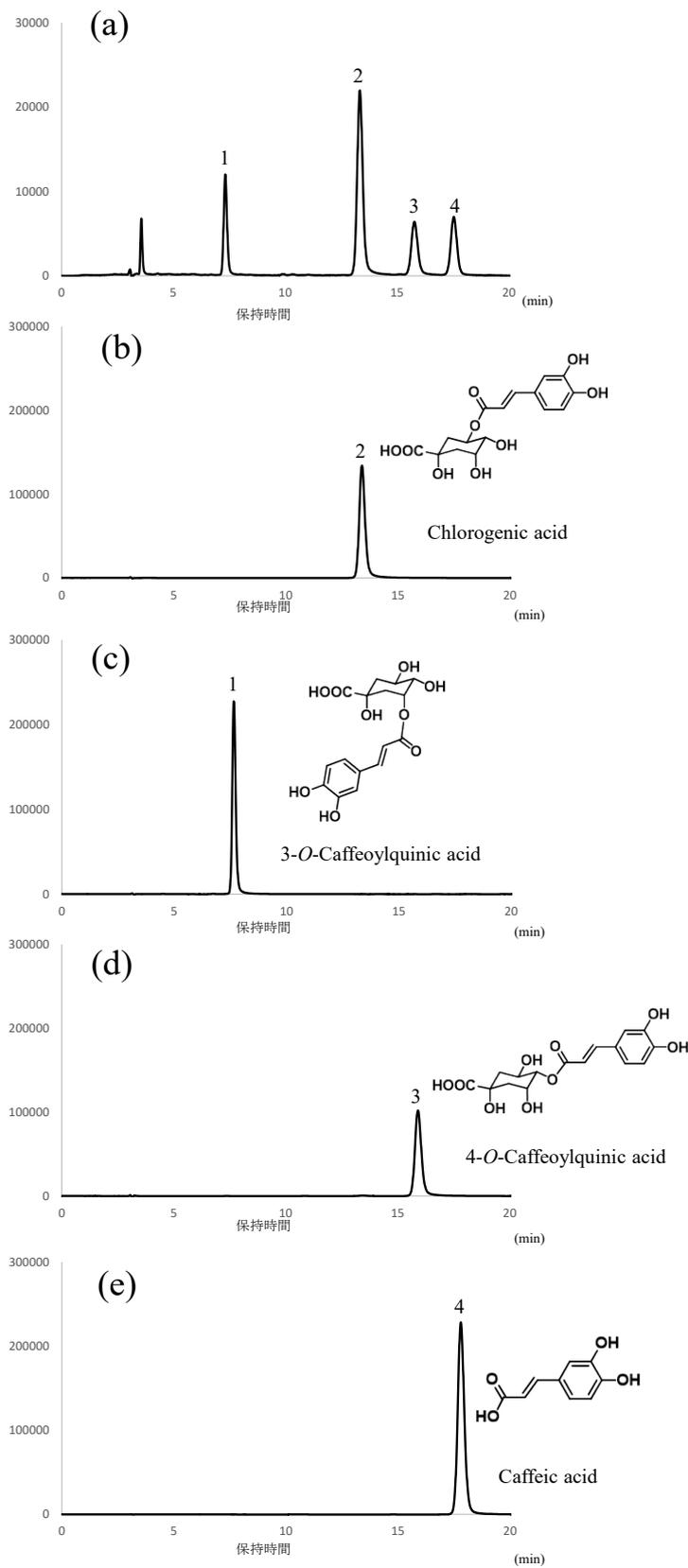


図4 ヒマワリ種子抽出物 (a), クロロゲン酸 (b), 3-O-カフェオイルキナ酸 (c), 4-O-カフェオイルキナ酸 (d), カフェ酸 (e) のクロマトグラム

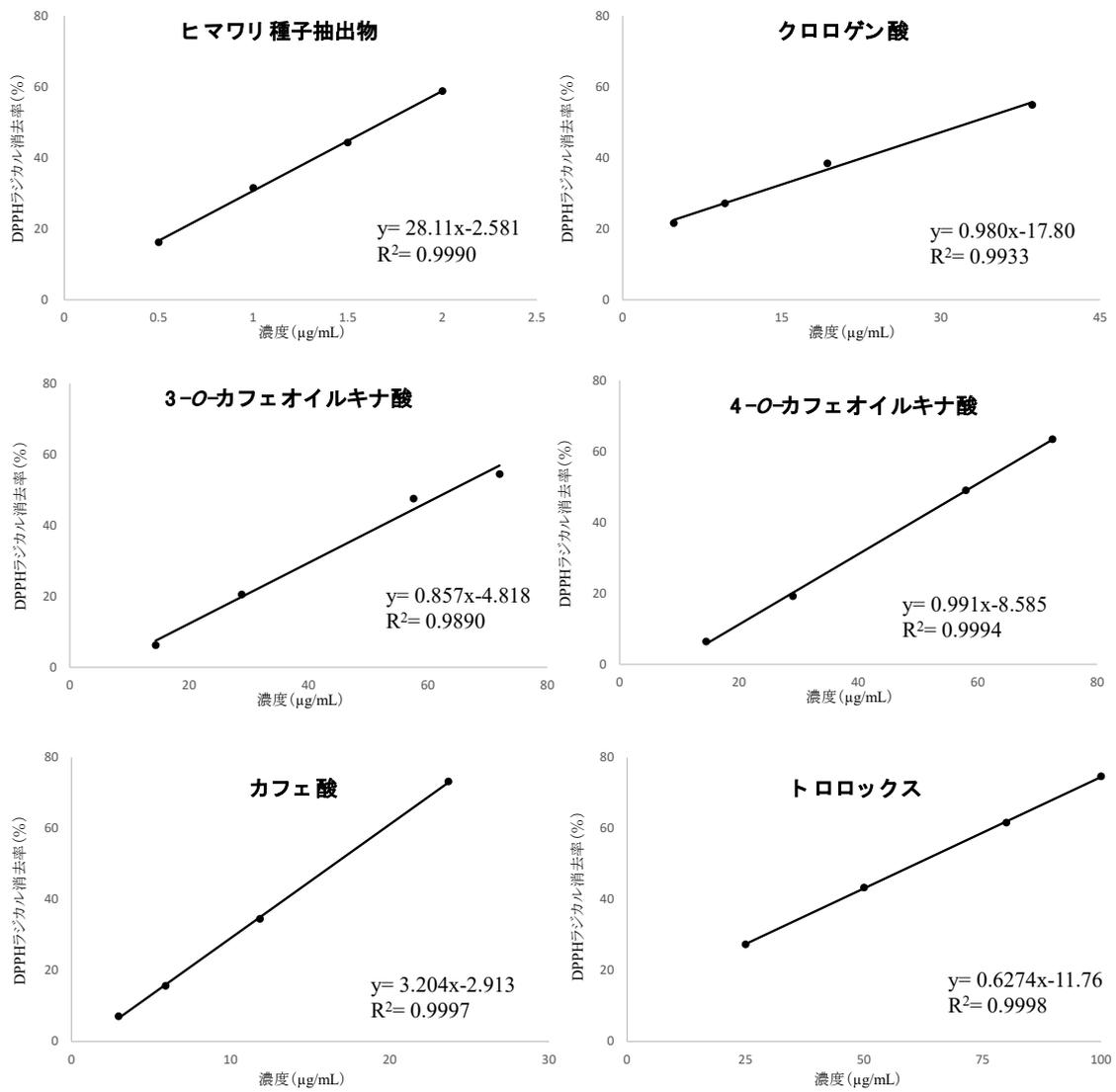


図5 ヒマワリ種子抽出物および各成分のDPPHラジカル消去活性

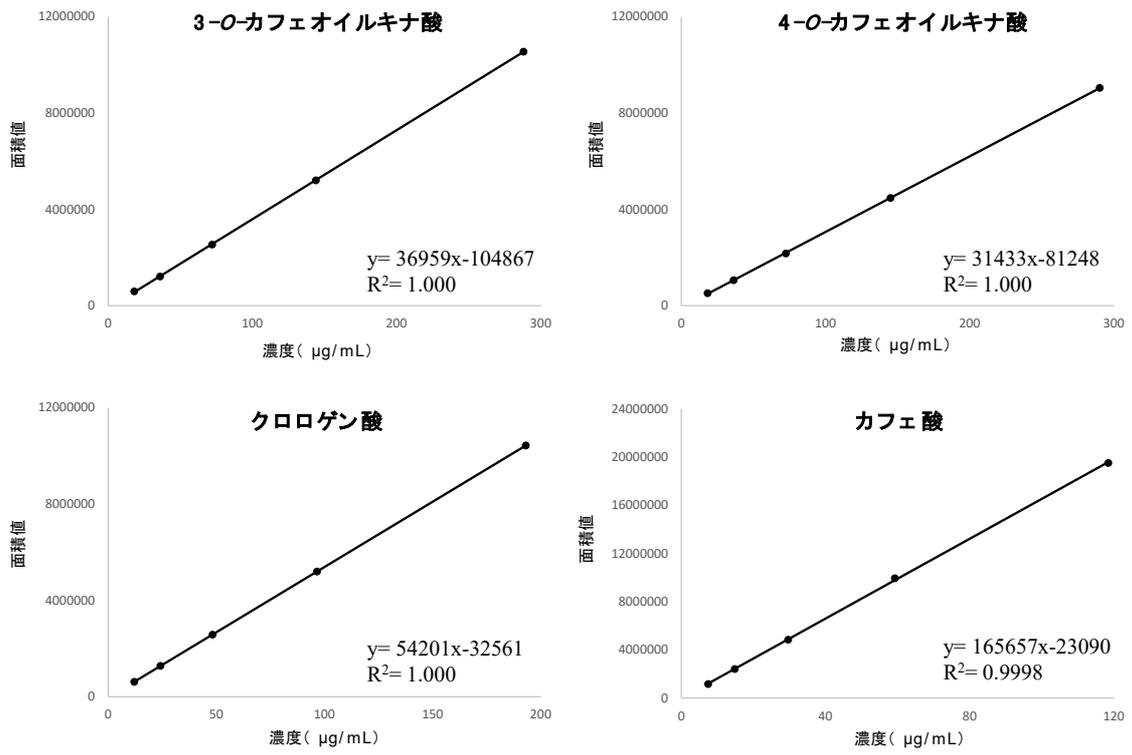


図 6 3-O-カフェオイルキナ酸, 4-O-カフェオイルキナ酸, クロロゲン酸, カフェ酸の代表的な検量線

表 1 ヒマワリ種子抽出物および各成分の DPPH ラジカル消去活性 (n=3)

| | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | RSD (%) |
|------------------------|--|------------|
| 3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸 | 63.5 | 1.8 |
| 4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸 | 59.0 | 2.7 |
| クロロゲン酸 | 32.9 | 3.2 |
| カフェ酸 | 16.5 | 0.1 |
| トロロックス | 61.2 | 1.3 |
| ヒマワリ種子抽出物 | 1713 | 1.7 |

表 2 3-*O*-カフェオイルキナ酸, 4-*O*-カフェオイルキナ酸, クロロゲン酸, カフェ酸の TEAC

| | TEAC |
|------------------------|------|
| 3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸 | 0.96 |
| 4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸 | 1.04 |
| クロロゲン酸 | 1.86 |
| カフェ酸 | 3.70 |

表3 ヒマワリ種子抽出物に含まれる主要成分の含量 (%) (n=3)

| | 含量 (%) | RSD (%) |
|------------------------|-----------|------------|
| 3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸 | 0.62 | 1.1 |
| 4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸 | 0.65 | 0.5 |
| クロロゲン酸 | 0.79 | 0.4 |
| カフェ酸 | 0.09 | 0.3 |