

沖繩産天然抗酸化物質の探索とその応用開発

— ベニバナボロギク中の抗酸化成分の単離と同一 —

市場俊雄、安仁屋洋子¹

1 はじめに

近年、糖尿病・高血圧・ガンなどの疾病の病態に活性酸素が関与していることが明らかとなってきている¹⁾。従って活性酸素を消去する抗酸化物質は疾病予防・健康保持に極めて重要であり、適宜な抗酸化物質の積極的活用は健康増進・疾病予防の大きな戦略となりうる。沖縄では古くから薬草を食用や飲用に使用してきており、これらの中には抗酸化作用を有するものも多く²⁾、このような習慣も沖縄の人々の健康長寿の一因となっていると考えられる。我々はこれまで地域コンソーシアム研究開発事業で、沖縄産薬草の強い抗酸化作用を検討し、健康増進・疾病予防に活用できる魅力ある資源であることを確認している³⁾。

本研究は、これまでの研究結果を踏まえて、抗酸化作用を有する沖縄産薬草などから健康保持薬（健康食品）の開発を行うことを最終目標に、それら薬草の有効成分の分析・薬効・作用機序・安全性の検討を琉球大学医学部と共同で行っている。工業技術センターの分担課題は、琉球大学でのスクリーニング結果に基づいて薬草の優先順位付けを行い、その順に従って抗酸化活性成分を単離構造決定することである。平成12年度は、ベニバナボロギクから6種類の抗酸化成分を単離しその構造を明らかにした。また、動物試験のための大量分取法の検討も行ない、高速向流クロマトグラフィーにより分取した試料を琉球大学に提供した。以下に、この研究結果について述べる。

2 実験方法

2-1 装置

抗酸化試験には、バイオマーの96ウェルマイクロプレートを用い、バイオテックインストルメンツのマイクロプレートリーダー（ELx800）により吸光度を測定し、KC4ソフトウェアでデータの取り込みを行った。

溶媒抽出には、ダイオネクスの高速溶媒抽出装置ASE 200を用い、抽出槽はASE 200専用のステンレス製33mL抽出槽を用いた。

抽出物の分析では、高速液体クロマトグラフィー装置にウォーターズ（送液部：2690、検出器：996、データ

処理：Millennium32）およびポリマーラボの光散乱検出器PL-ELX 1000を用い、カラムとしてウォーターズのSymmetry C18（4.6mm×100mm、3.5 μ m）及びSymmetry Shield C8（4.6mm×100mm、3.5 μ m）を使用した。

成分の粗分離に三菱化学の合成樹脂HP20、または東ソーのゲルろ過剤TOYOPEARL HW40Fを使用し、精製にウォーターズの高速度液体クロマトグラフィー装置（送液部：600E、検出器：UV9486、データ処理：Millennium32、カラム：Symmetry C18およびC8、19mm×150mm、10 μ m）を用いた。

¹H-および¹³C-NMRスペクトル測定には日本電子の核磁気共鳴装置JNM-400を、APCIマス測定には質量分析装置JMS-700を使用した。

2-2 試薬および溶媒

本実験で用いる全ての水は上水を実験室でイオン交換後、蒸留したものを用いた。クロマトグラフィー用の有機溶媒は（メタノール、アセトニトリル）関東化学の特級溶媒を用いた。エタノールはナカライ特級試薬を、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）、ピリジン、無水酢酸は和光純薬の特級試薬を、またトリフルオロ酢酸はナカライテスクの特級試薬を用いた。

2-3 試料の調整および抽出

琉球大学から供給された乾燥薬草は、粉碎機にて2分程度粉碎を行った後、850 μ mの篩で粗粒子を取り除き、次に試料30gをセライト30gと良く混ぜ合わせ、ASE 200用の33mL抽出セルに充填（10gずつ6本）し、抽出温度100℃、抽出圧力1500psi、パージボリューム50%、パージ時間120秒で水で抽出を行なった。薬草抽出液（45mLずつ6本）はポリプロピレン製の容器に移し密栓し、5℃で活性測定および分離精製まで保存した。

2-3 DPPHラジカル消去作用の測定

2-3-1 試料および試薬の調製

保存抽出液2mLづつを4mLバイアル瓶に量り取り、遠心エバポレーターで乾固した後秤量し、エタノール/水1：1溶液を加えて1mg/mLの濃度に調整して活性測定用の試料とした。化合物は、1mg/mLになるよう50%エタノールで調製した。

¹琉球大学医学部保健学科

DPPHは、0.75mMの濃度でエタノールに溶かして密閉容器に入れ、冷暗所に保存し、使用前に室温に戻し、30分以上スターラーで攪拌して測定に用いた²⁾。

2-3-2 DPPHラジカル消去作用の測定

活性は、DPPH/マイクロプレート法を用いEC₅₀を算出する方法で測定した²⁾。

2-4 ベニバナボロギクの抗酸化成分の単離 (図1)

まず抽出液280mLを水で2.8Lに希釈し、HP20を充填したカラム (40mm×150mm) に通し、吸着物をメタノールの濃度を上げながら (メタノール/水10:90、25:75、50:50、75:25、100:0、500mLずつ) 6段階で順次溶出させた。DPPHにより抗酸化活性を示した3フラクション (メタノール/水25:75、50:50、75:25) を一端まとめた後、HPLCで活性成分の精製を行なった。

精製ではまずC18分取カラムで5つのメジャーなピークを分けてとり (メタノール/0.1%トリフルオロ酢酸水45:55から50:50へ直線のグラジエント)、ピーク1、3、4、5をそれぞれHW40F (16mm×600mm、メタノール/水 50:50) を用いたゲル濾過カラムで最終的な精製を行ない、化合物1、4、5、6を得た。一方ピーク2はC8カラムを用いた分取HPLCにより精製 (メタノール/0.1%トリフルオロ酢酸水45:55) し化合物2と3を単離した。

3 結果と考察

3-1 ベニバナボロギクの抗酸化成分の同定

化合物1の¹H-NMR (図2) には、カフェ酸 (化合物7、図3) に特徴的な1、3、4-三置換ベンゼンとトラ

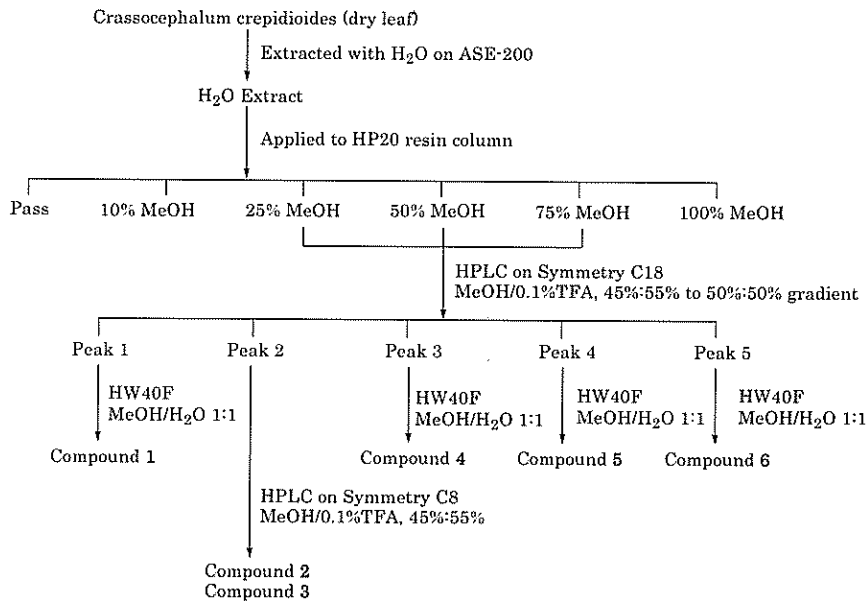


図1 ベニバナボロギク中の抗酸化成分の分離スキーム

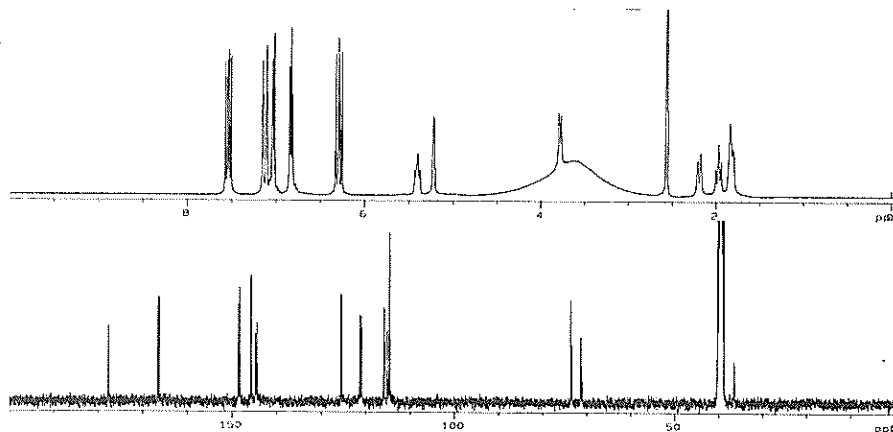


図2 化合物1の¹H-NMR(上)と¹³C-NMR(下)スペクトラ

ンスオレフィンに特徴的なシグナルがそれぞれ2セット観測された。これは ^{13}C -NMRの8本 \times 2セットのSP2シグナルと2本のエステルシグナルからも支持された。また ^{13}C -NMRに1本のカルボン酸シグナルと6本のSP3炭素シグナルが観測され、SP3シグナルのうち4シグナルが δ 70付近で酸素に結合した炭素であり、2本が δ 35付近のメチレン炭素であることから、植物中に広く分布する³⁾キナ酸(化合物8、図4)の関連化合物であると考えられた。そこで、各種2D-NMRの結果と、 ^1H -NMR中の2つの大きく低磁場シフト(δ 5.45と δ 5.20)したシグナルから、キナ酸のジカフェ酸エステルであるイソクロロゲン酸の一つであると推定した。さらに、カフェ酸の置換位置は、COSYスペクトルより3、4位に置換していることが分かった。最終的にこの構造は、 ^{13}C -NMRデータを報告値と比較することによりイソクロロゲン酸aであると確認した(図5)⁴⁾。

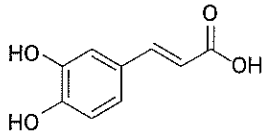


図3 カフェ酸(化合物7)

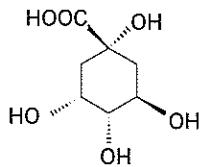


図4 キナ酸(化合物8)

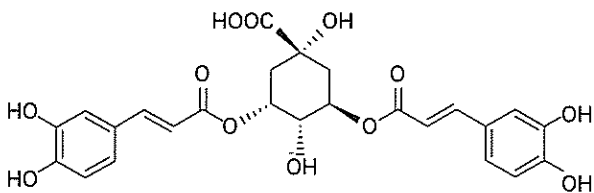


図5 イソクロロゲン酸a(化合物1)

化合物4も同様に、1D、2D-NMRよりキナ酸のジカフェ酸エステルであることが示唆された。その置換様式は、COSYスペクトルより3、4置換であることが分かり、そのスペクトルデータを報告値と比較することによりイソクロロゲン酸cであると同定した(図6)⁵⁾。

化合物2と3はHPLC上の挙動(保持時間とUVスペクトル)から、これまでにグアバから得られているケルセチンの配糖体であると考えられた。そこでこれらを一

部単離し、それらの ^1H 及び ^{13}C -NMRスペクトラを既知のものと比較したところ一致したので、それぞれケルセチン-3-ガラクトサイド(図7)とケルセチン-3-グルコサイド(図8)と決定した。

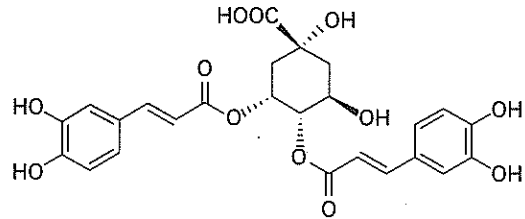


図6 イソクロロゲン酸b(化合物4)

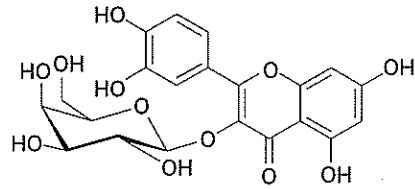


図7 ケルセチン-3-ガラクトシド(化合物5)

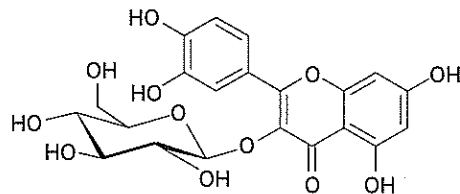


図8 ケルセチン-3-グルコシド(化合物6)

化合物5と6は、NMRスペクトル(図9)のかなりの部分がそれぞれ化合物2および3と良く一致していた。

特に3、5、7-O置換フラボノールの部分と、糖の部分はほとんど重ねあわせることが出来た。一方、フラボノールC環はケルセチンでは3置換で環上の水素が ^1H -NMRで3種類観測され、それらの関係は1、3、4位の関係に有り非対象であった。しかしながら化合物5と6では2H分のダブルレットが1対観測された。さらに ^{13}C -NMRでも炭素2個分と考えられるシグナルが2本観測されることから、C環は1、4二置換ベンゼンであり、化合物5と6のアグリコン部分はケンフェロールであると推定できた。さらに化合物2と3との一致から、糖はガラクトースおよびグルコースであると推定でき、既知化合物のデータと比較したところ一致したので、化合物5と6はそれぞれケンフェロール-3-ガラクトサイド(図10)とケンフェロール-3-グルコサイド(図11)であると決定した⁶⁾。

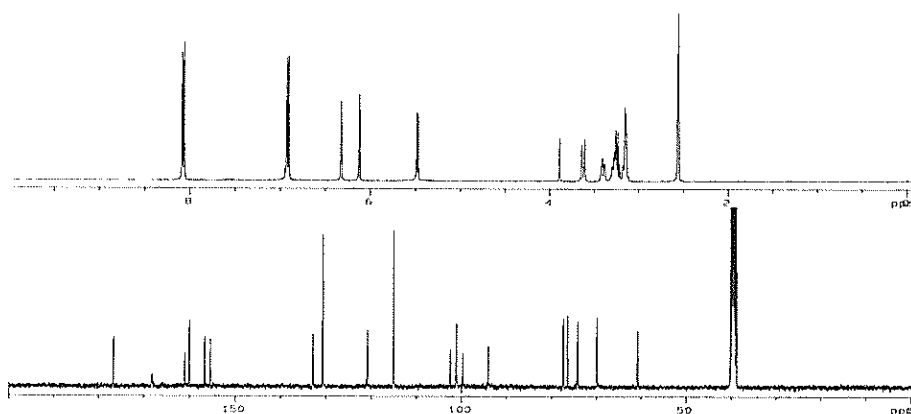


図9 化合物2の¹H-NMR(上)と¹³C-NMR(下)スペクトラ

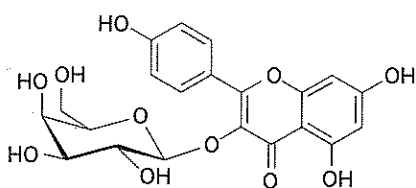


図10 ケンフェロール-3-ガラクトシド (化合物2)

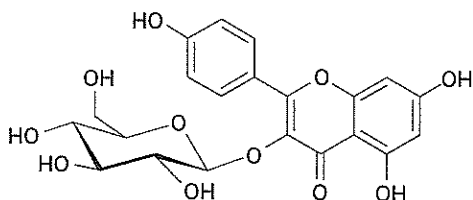
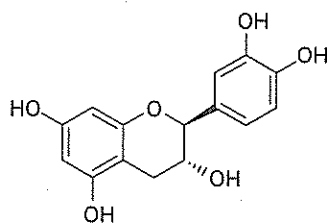
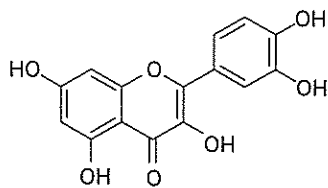


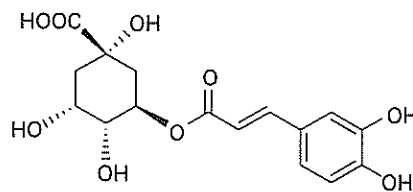
図11 ケンフェロール-3-グルコシド (化合物3)



カテキン



クエルセチン



クロロゲン酸

図12 代表的な天然抗酸化物質

3-2 ベニバナボロギク抗酸化成分の活性

単離・同定した6化合物のDPPHラジカル消去活性を測定した結果、イソクロロゲン酸類とクエルセチン配糖体は代表的な天然抗酸化物質である(図12)カテキン、クエルセチンおよびクロロゲン酸と同等の活性を示したが、ケンフェロール配糖体は1000 μ Mでも50%消去に達しなかった。表1に活性試験の結果を示した。

表1 ベニバナボロギクから単離した化合物のDPPHラジカル消去活性

化合物名	DPPHラジカル消去活性 EC ₅₀ (μ M)
イソクロロゲン酸 a と c (化合物1、4)	53
クエルセチン-3-ガラクトシド (化合物2)	47
クエルセチン-3-グルコシド (化合物3)	56
ケンフェロール-3-ガラクトシド (化合物5)	> 1000
ケンフェロール-3-グルコシド (化合物6)	> 1000
カテキン	59
クエルセチン	67
イソクロロゲン酸	54

4 まとめ

今回、ベニバナボロギクの抗酸化活性成分に関して単離と同定を行なった結果、主要成分は植物に普遍的に含まれるクロロゲン酸類、ケルセチン配糖体およびケンフェロール配糖体であることが分かった。これらの成分はこれまでも多くの植物から報告されており、またその薬理活性についても積極的に研究が行なわれている。その薬理活性の多くは、他のポリフェノール類同様の抗酸化能に由来する活性であり、その効果は実証済みである。従って、これらポリフェノール類を豊富に含むベニバナボロギクは今後薬草としての開発の価値が十分にあるものと考えられる。また、この薬草は沖縄の気候で通年栽培が可能であることから、今後県産資源として有望な開発候補と考えられる。

5 参考文献

- 1) 美濃真、島崎弘幸、二木鋭雄編 抗酸化物質 学会出版センター 1996
- 2) 平成10年度地域コンソーシアム研究開発事業 有用生物資源の多目的利用のための加工製造システムの研究開発 成果報告書 2000
- 3) 村上孝夫著 天然物の構造と化学 廣川書店 1987
- 4) Machida, M., Kikuchi, M. *Phytochemistry* 1992, 31, 3654-3656
- 5) Timmermann, B. N., Hoffmann, J. J., Jolad, S. D., Schram, K. H., Klenck, R. E., Bates, R. B. *J. Nat. Prod.* 1983, 46, 365-368
- 6) P. K. Agrawal編 Carbon-13 NMR of Flavonoids (studies in organic chemistry 39) Elsevier, 1989

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。