

沖縄産薬草を活用した独創的な生活習慣病予防食品の開発

(沖縄産学官共同研究推進事業)

分担テーマ：薬草成分の分離・同定の研究開発

市場俊雄

モモタマナ、ボタンボウフウ、およびベニバナボロギク中の抗酸化成分の分離・同定を行い、それら成分を大量に精製する技術を確立した。これによりこれら薬草有効成分の薬理的な機能性の研究が可能になった。今回新たに薬草成分としてボタンボウフウからネオクロロゲン酸を単離し同定した。この成分には強い抗酸化作用があることが確認された。

1 はじめに

近年、薬草を用いた健康食品・機能性食品の開発にあたり、その有効成分の化学的検証、即ち有効成分の同定が重要であることが急速に認識されるようになってきている。我々はこれまでに伝承的に効能がうたわれている県産薬草の化学的研究を行い、ウコンイソマツ中の没食子酸、グアバ中のケルセチン配糖体などの成分と効能の相関をこれまでに実証してきた¹⁾。

今回の共同研究事業の中で沖縄県工業技術センターでは、これまでの地域コンソーシアム研究開発事業などの結果^{1,2)}を踏まえて、詳細な薬理試験を行うための活性化化合物の効率的な供給法の確立を目的に研究を行い、きく科のベニバナボロギク (*Crassocephalum crepidioides* S. Moore) 中の2種のクロロゲン酸関連化合物、しくんし科のモモタマナ (*Terminalia catappa* L.) 中の2種のエラグタンニン、せり科のボタンボウフウ (*Peucedanum japonicum* Thunb.) 中のクロロゲン酸関連化合物を100 mgスケールで単離する方法を確立した。またボタンボウフウエキスからは新たに、ネオクロロゲン酸を抗酸化活性成分として同定したので報告する。

2 方法

2-1 装置

溶媒抽出には、ダイオネクスの高速溶媒抽出装置 ASE200 を用い、抽出槽は ASE200 専用のステンレス製 33 mL 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 (HPLC) にウォーターズ Alliance (送液部: 2690、検出器: 996、データ処理: Millennium³²⁾) を用い、カラムとしてインタクトの Cadenza CD-C18 (4.6 mm × 100 mm) を使用した。

成分の粗分離には三菱化学の合成樹脂 DIAION HP20 (40 mm × 150 mm ガラスオープンカラム) と YMC の ODS-AM120-S50 (30 mm × 300 mm ガラス中圧カラム) を使用した。精製にはウォーターズの高速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⁾) と YMC の YMC-Pak ODS-AM-S5 (20 mm × 250 mm) カラム、Waters の Symmetry C18 (19 mm × 300 mm) カラムを用いた。また、ゲルろ過では東ソーの TOYOPEARL HW40F (20 mm × 500 mm) を使用した。

構造決定では、日本電子の核磁気共鳴装置 (NMR) JNM-LA-400 及び質量分析装置 (MS) JMS-700 を使用した。

2-2 試薬及び試料

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篩い分けし粗粒子 (>2 mm) および微粒子 (<0.85 mm) を取り除き、ポリプロピレン製の保存容器で抽出を行うまで保存した。またボタンボウフウは提供された粉末試料をそのまま用いた。

抽出溶媒にはエタノール (ナカライテスク、一級試薬) と脱イオン水 (上水を蒸留後脱イオン) を使用し、抽出の際のマトリックスとしてセライト (ナカライテスク、スーパーセル) を用いた。

クロマトグラフィー用のメタノール (MeOH、関東化学、特級) および水 (上水を蒸留後脱イオン) は 0.45 μm メンブレンでフィルターしてから使用した。酢酸 (AcOH) は和光純薬の特級試薬を、n-ヘキサン、酢酸エチル、n-ブタノールは関東化学の特級試薬を用いた。

2-3 HPLC 分析の条件

カラム温度：45℃

流速：1 mL/min

検出：210-600 nm でのマックスプロット

溶媒系：1%酢酸/メタノール8：2→メタノールへの直線グラジエント、1 mL/min

2-4 ベニバナボロギク抗酸化成分の単離

抽出は ASE200 を用いて行った。抽出に用いた試料量は 30 g で、試料をセライトと 1 対 1 で混合した後 33 mL の抽出セル 6 本に充填した。これをエタノール/脱イオン水 1 対 1、100℃で 10 分間、2 回抽出を行った。

分離では、まず抽出液（約 270 mL）中のエタノールを減圧下で濃縮・除去した後、ヘキサンで脱脂を行った。この脱脂抽出液はヘキサン除去後さらにブタノールで分液しブタノール抽出物を得た。得られたブタノール抽出物は C18 の中圧カラムで粗分画を行い（1%酢酸/メタノール9：1→メタノールへの直線グラジエント、20 mL/min）、粗イソクロゲン酸 A と C を得、これを分取 HPLC で最終的な精製を行い（1%酢酸/メタノール7：3、10 mL/min）イソクロゲン酸 A と C をそれぞれ 144 mg と 276 mg 単離した（図1）。

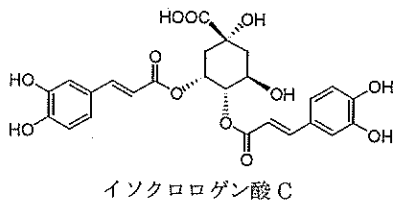
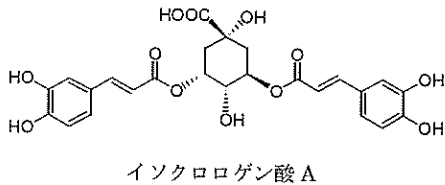


図1 ベニバラボロギクから単離した成分

2-5 モモタマナ中の活性成分の単離

抽出は ASE200 を用いて行った。抽出に用いた試料量は 30 g で、試料をセライトと 1 対 1 で混合した後 33 mL の抽出セル 6 本に充填した。これをエタノール/脱イオン水 1 対 1、100℃で 10 分間、2 回抽出を行った。

分離ではまず抽出液（約 270 mL）中のエタノール

を減圧下で濃縮・除去した後、ヘキサンで脱脂を行った。この脱脂抽出液はヘキサン除去後さらにブタノールで分液しブタノール抽出物を得た。次に HPLC 分析によりタンニン類の溶出画分を確認しながら、ブタノール抽出物を CPC で粗精製し（酢酸エチル/水、2 mL/min、下層を移動相）、粗ケブラグ酸と粗コリラジンを得た。最後にそれぞれの成分を HPLC により精製することで（1%酢酸/メタノール7：3、10 mL/min）ケブラグ酸(260 mg)とコリラジン(180 mg)を得た（図2）。

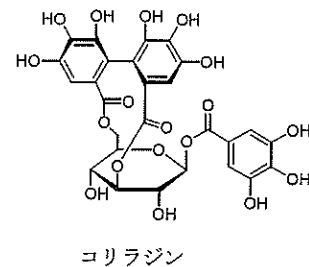
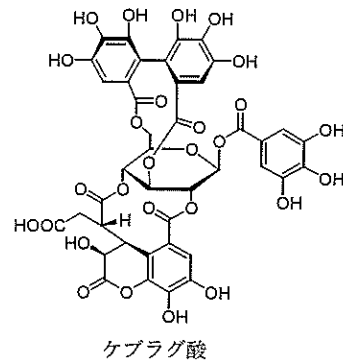


図2 モモタマナから単離した成分

2-6 ボタンボウフウ中の活性成分の単離

抽出は ASE200 を用いて行った。抽出に用いた試料量は 260 g で、試料をセライトと 1 対 1 で混合した後 33 mL の抽出セル 50 本に充填した。これを脱イオン水を用い 100℃で 10 分間、2 回抽出を行った。

分離ではまず抽出液（2250 mL）を HP20 カラムに通し、カラムを水で洗浄した後、メタノール濃度を上げながら吸着物を溶出させた。50%メタノール溶出画分に抗酸化活性が認められたため、これを中圧カラムクロマトグラフィー（1%酢酸/メタノール 80：20→メタノールへの直線グラジエント、20 mL/min）および HPLC（1%酢酸/メタノール 85：15→50：50への直線グラジエント、10 mL/min）で精製し 155 mg の活性化化合物を得た。

3 結果と考察

3-1 ベニバナボロギクの成分に関して

ベニバナボロギク中のイソクロロゲン酸は、季節によりその含有量が大きく異なることが分かっている¹⁾。また、今回これらの化合物はベニバナボロギク全草を用いて抽出・精製したが、花と茎にはイソクロロゲン酸類はほとんど含まれないことが分かっていることから、今後ベニバナボロギクを健康茶などとして製品化する場合、これらの点に充分配慮し、イソクロロゲン酸類の効果を最大限に生かす開発をする必要があると思われる。

一方、イソクロロゲン酸類は、これまでにベニバナボロギクの他にニシヨモギからも単離されている¹⁾。そこで、イソクロロゲン酸の効果を生かした製品化を考える場合、原料としてニシヨモギ等の検討またはブレンドなども重要であると考えられる。

3-2 モモタマナの成分に関して

モモタマナは実際にタンニンを豊富に含むことが知られている¹⁾。今回の研究で葉にもタンニン類が多く含まれることがわかった。今研究では2種類のタンニンを単離するにとどまったが、今後更に研究を行い、その他のタンニン類についても精製品の薬理活性を検討することも重要だと思われる。また、このタンニン混合物としてのモモタマナ葉抽出エキスの利用法を考える上で、酸化されやすいなどのタンニンの化学的性質を十分に考慮し、その機能を最大限に生かせる利用法を開発するよう心がける必要があると思われる。

3-3 ポタンボウフウの活性成分の同定

活性化合物は、LC-MS からクロロゲン酸と UV スペクトルと質量数が一致し、C18 カラムでの保持時間が異なることが分かっていた。このことから、化合物はクロロゲン酸以外のキナ酸のモノカフェ酸エステル（1-O-カフェキナ酸、クリプトクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸）のうちのいずれかであることが予想された（図3、4）。

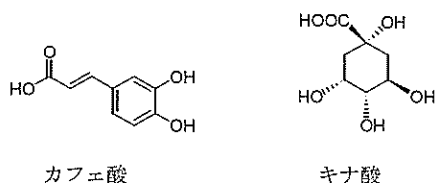


図3 カフェ酸およびキナ酸の構造

そこでクロロゲン酸のそれぞれの異性体を区別する方法を検討したところ、¹H-NMR でのカフェ酸の付

根の炭素に付いた水素の化学シフトの違いを見ることで、これら4つの化合物が区別できることが分かった。

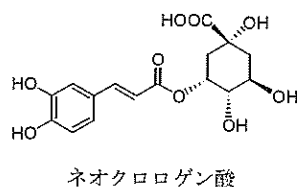
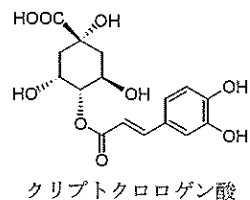
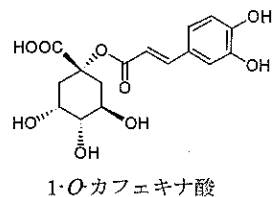
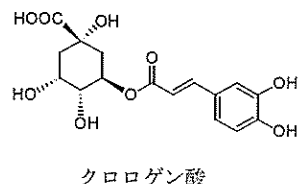


図4 クロロゲン酸類の構造

すなわちキナ酸を基準として、低磁場 ($\delta 5$ 付近) にシフトした水素シグナルのカップリングパターンを見ることで、1、3、4、5位のどこにカフェ酸が置換しているかを判断できる。

もし1位に置換している場合（1-O-カフェキナ酸）、 $\delta 5$ 付近にシフトするシグナルは観測されない。一方、3位に置換しているクロロゲン酸の場合、3つ共に 2 Hz 程度のカップリング定数を持つ ddd（ダブルット・ダブルット・ダブルット）が $\delta 5$ 付近に観測され、4位に置換している場合（クリプトクロロゲン酸）、2つ共に 2 Hz 程度のカップリングの dd（ダブルット・ダブルット）が $\delta 5$ 付近に観測され、5位に置換している場合（ネオクロロゲン酸）、3つのカップリングの内 2つが 2 Hz 程度で1つが 15 Hz 程度の ddd が $\delta 5$ 付近に観測されるはずである。

この推測に基づいてクロロゲン酸の ¹H-NMR を検討してみると、 $\delta 5.05$ にカップリング定数の小さい

dddが観測された。一方、活性化化合物では δ 5.16に7.1、3.5 Hzのdtが観測される。これは $J_{eq-eq}=J_{eq-ax}=3.5$ Hzとなりトリプレット(t)として観測されたと考えられる(COSYによりC2-C3-C4-C5の 1H の帰属を行った)。

以上のことおよび文献値との比較³⁾から活性化化合物はネオクロロゲン酸であると同定した。

3-4 ボタンボウフウの成分に関して

これまでの研究²⁾で、ボタンボウフウエキスの中で中極性の画分の主成分がクロロゲン酸からなることが分かっていたが、今回の研究で、水溶性画分にはネオクロロゲン酸が多く含まれることが分かった。今後ボタンボウフウの抗酸化活性を利用した製品開発を考える上で、クロロゲン酸とネオクロロゲン酸の活性の差や、溶解性の違いなどを十分に考慮する必要があると思われる。

4 まとめ

今回の研究で、ボタンボウフウの抗酸化活性成分の主なものはクロロゲン酸とその異性体であるネオクロロゲン酸であると同定した。

3種の葉草類から今回単離した主成分(イソクロロゲン酸A、イソクロロゲン酸C、ネオクロロゲン酸、コリラジン、ケブラグ酸)に関してはスケールアップにより100 mgオーダーでの供給が可能が確認できた。ただし、タンニン類のコリラジンとケブラグ酸は高純度の試料を得ることが困難であるため、さらに効率のよい単離法を今後検討する必要がある。また、イソクロロゲン酸の効果を利用した製品開発には葉草の栽培を含めた包括的な研究が不可欠であると思われる。

謝辞

本共同研究事業に参加できる機会を与えていただいたプロジェクトリーダーの安仁屋洋子琉球大学医学部教授をはじめ以下の共同研究者の方々、および研究管理・コーディネートを行なっていただいた(財)亜熱帯総合研究所の方々に感謝いたします。

國永秀樹 農業生産法人(有)仲善葉草農場専務取締役
吉見直己 琉球大学医学部教授
荻谷研一 琉球大学医学部教授
荒木弘一 琉球大学医学部教授
野口克彦 琉球大学医学部助教授
尾尻義彦 琉球大学医学部助手
比嘉辰雄 琉球大学理学部教授

山崎秀雄 琉球大学遺伝子実験センター教授
上江洲榮子 琉球大学教育学部教授
大澤俊彦 名古屋大学大学院生命農学研究科教授
大東肇 京都大学大学院農学研究科教授
稲福直 (株)琉球バイオソース開発取締役企画開発室長
藤野哲也 (株)琉球バイオソース開発基礎研究課長
久保田めぐみ (株)琉球バイオソース開発応用研究課長
与那覇恵 (株)琉球バイオソース開発研究員
豊見山純男 農業生産法人(有)仲善葉草農場研究員
新里英正 農業生産法人(有)仲善葉草農場研究員
野中亮 農業生産法人(有)仲善葉草農場研究員

参考文献

- 1) 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」(第2年度) 成果報告書 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (2000)
- 2) 「沖縄産天然抗酸化物質の健康保持薬としての開発に関する薬理・化学的研究」平成11~13年度 科学研究費補助金 地域連携推進研究費(2) 研究成果報告書 文部科学省 (2000)
- 3) Waiss, A. C. et al. *Chem. Ind. (London)* 1964 (1984)
- 4) 「世界有用植物事典」堀田満編集 平凡社 (1996)

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。