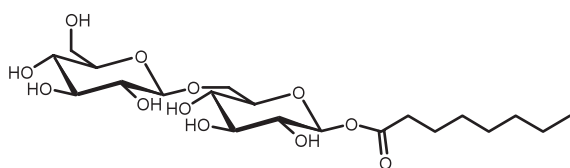


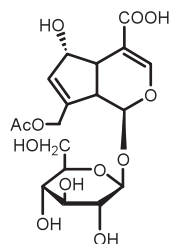
沖縄産ノニジュースに含まれる生理活性物質の単離と同定

市場俊雄

ノニの果汁から単離・同定されたNB10とNB11は、JNK (c-Jun N-terminal kinase) 阻害活性を持つことが示唆された。本研究では沖縄産ノニ果実を用いたノニジュース中にもこれら2成分が含まれていることを確認するために成分の単離を行った。その結果、沖縄で栽培されたノニ果実を用いたノニジュースにも、NB10とNB11の活性成分が含まれていることが確認できた。



NB10の構造



NB11の構造

1 はじめに

ノニは健康食品として注目を集めている天然素材の一つである。以前から沖縄県内では八重山地域を中心に染料として利用されていたが、ポリネシアをはじめとする南太平洋諸島では古くから健康食品として利用されていた¹⁾。県内では4年ほど前から、主にタヒチ産のノニが輸入され、健康飲料として製品化されている。しかし、その効果に関する化学的な研究報告は少なく、抗癌活性、抗酸化活性などに関する薬理的な研究の報告が主である²⁾。成分に関しては根中のアントラキノン類、クマリン類、イリドイドなどに関する研究報告や果実中の配糖体に関する報告が散見されるが³⁾、成分と薬理活性を関連付けた報告は少ない⁴⁾。

NB10とNB11はノニの果汁から単離され同定された成分である⁵⁾⁶⁾。琉球大学の荻谷教授の調査で、ノニジュース中のNB10とNB11がJNK阻害活性を持つ可能性が示唆されたため、H17年度沖縄産学官共同研究推進事業の一環で同教授との共同研究を行った。本研究では沖縄産ノニ中にこれら2成分が含まれているかを確認し、そのJNK阻害活性を検証するために同成分の単離を行った。その結果、沖縄で栽培されたノニ果実を用いたノニジュースにも、NB10とNB11が含まれていることを確認したので報告する。

2 実験材料および方法

2-1 試薬および機器

HPLC分析は、送液システム(ウォーターズ アライアンス 2695)、MS検出器(マイクロマス Quattro micro API)を用いて行った。

エキスの粗分離には、DIAION HP20(三菱化学 80mmID×300mmL 自家充填ガラスオープン)、送液システム(島津 LC8A×2)、カラム YMC ODS-AQ S-50(ワイエムシイ 30mmID×300mmL 自家充填ステンレス)を使用した。

HPLC分取は、送液システム(ウォーターズ 600E)、UV-VIS検出器(ウォーターズ 2487)、MS検出器(マイクロマス ZQ)、カラムは YMC ODS-A(ワイエムシイ 5μm 20mmID×250mmL、20mmID×50mmL ガードカラム付き)、または Asahipak GS-310 20G(ショウデックス 20mmID×500mmL)を使用した。

溶媒および試薬類は、分液に特級n-ブタノール(和光純薬工業)、トリチュレートに特級メタノール(和光純薬工業)、HPLC用移動相には、超純水(電気伝導度 0.06μs以下の蒸留/脱イオン水)、高速液体クロマトグラフ用メタノール(和光純薬工業)、高速液体クロマトグラフ用酢酸(和光純薬工業)、特級メタノール(和光純薬工業)、精密分析用酢酸(和光純薬工業)、酢酸アンモニウム(和光純薬工業)を使用した。

NMRはJNM-LA400(日本電子)を使用して測定した。また分子量測定は、質量分析装置(マイクロマス ZQ)を用いインフュージョン法で行った。

2-2 NB10およびNB11含有フラクションのHPLC分析による確認条件

カラムには YMC-Pack Pro C18(ワイエムシイ 3μm 4.6mmID×100mmL)を用い移動相に 400mM 酢酸アンモニウム、超純水、メタノールを使用した。分析の際に使用したグラジエント条件を図1に示す。

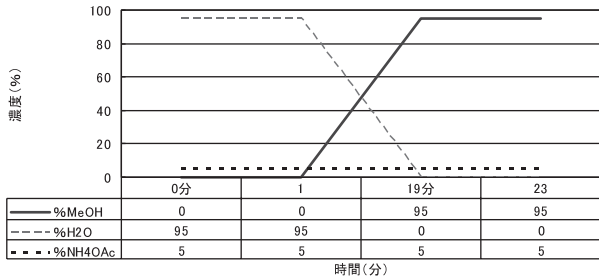


図1 分析のグラジエント条件

分析の際のカラム温度は 25℃、流速は 1.0mL/min、スプリット比は約 1 : 2 で (MS 側 350 μL/min、廃液側 650 μL/min)、注入量は 5~20 μL、イオンソースは ESI を用いイオンソース温度は 350℃、デソルベーション温度は 100℃、キャピラリー電圧は 3.2kV、コーン電圧はポジティブ時 25V、ネガティブ時 30V に設定した。

2-3 NB10 の単離

原料は、県内で栽培されたノニから収穫されたノニ果実を、通常の加工工程により 3 週間熟成させ得られたノニ搾汁 15L を用いた。ジュースはろ過後約半量の 7.2L まで減圧濃縮し、これにブタノールを 3.6L 加え分液した。ブタノール相 4.2L を取り除き、残った水相にさらにブタノール 4.2L を加え分液した。両ブタノール相は合わせた後、ブタノールと水を減圧で除去し完全に乾燥した。次に乾燥したブタノールエキスにメタノール 250mL を加えてトリチ

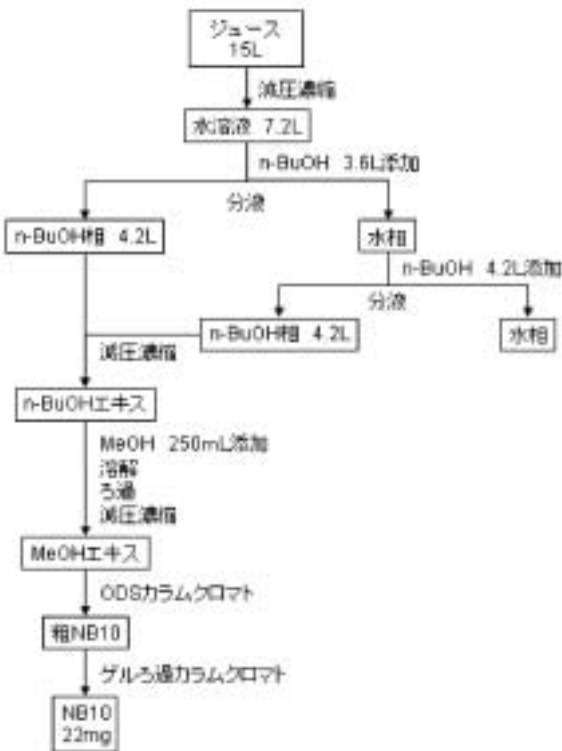


図2 NB10 (化合物 1) の分離過程

ュレートした。その結果得られたメタノール溶液をガラスフィルターでろ過した後 50mL まで濃縮した。このメタノール可溶部を LC/MS により分析したところ ESI ネガティブモードで m/z467 ([M-1]⁻)、ESI ポジティブモードで m/z486 ([M+NH₄)⁺) で検出できる NB10 に相当するピークが含まれていた。次にこの NB10 含有フラクションを中圧カラムクロマト、さらにゲルろ過クロマトで分取し、NB10 (化合物 1、22mg) を精製した。ノニジュースからの NB10 (化合物 1) の分離過程を図 2 に示した。

2-4 NB11 の単離

原料は、県内で栽培されたノニから収穫されたノニ果実を、通常の加工工程により熟成させ得られたノニ搾汁 1L を用いた。これをまず DIAION HP20 に吸着させ、メタノール濃度 (v/v) を段階的に変えながら溶出した (5%、25%、50%、75%、100%)。溶出した各フラクションを LC/MS により分析したところ、25%メタノールと 50%メタノール溶出フラクションに NB11 に相当する m/z431 ([M-1]⁻) のピークが含まれていたことからこれらを合わせて濃縮し、50g の NB11 含有フラクションを得た。次にこの NB11 含有フラクションを中圧カラムクロマトと HPLC (ODS) で分取し、粗 NB11 (化合物 2) を得た。

粗 NB11 は最終的にゲルろ過クロマトを行い、140mg を精製した。ノニジュースからの NB11 (化合物 2) の分離過程を図 3 に示した。

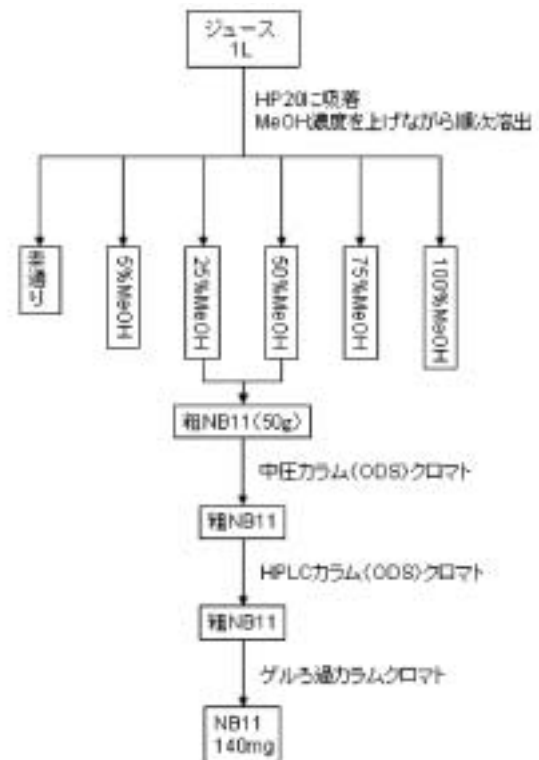


図3 NB11 (化合物 2) の分離過程

3 結果と考察

3-1 NB10の単離と同定

ノニジュースのブタノール可溶部を ODS で粗分画しゲルろ過により精製し化合物 **1** を単離した。含有率が低く UV 吸収が全く無い化合物 **1** の各画分での確認は、LC/MS によるアンモニウム付加イオンの検出により行った。

単離した化合物 **1** の分子量は ESI-MS により m/z 468 であることを確認し、NB10 の報告値⁵⁾と ¹³C-NMR スペクトルデータの詳細な比較を行った。その結果を表 1 に示す。この比較の結果今回ノニジュースから得られた化合物 **1** を NB10 と同定した。

表 1 化合物 **1** と NB10 の ¹³C-NMR データ比較表

	化合物 1	NB10		化合物 1	NB10
	δ C	δ C		δ C	δ C
C-1	174.1	174.1	C-4'	70.9	70.8
C-1''	104.4	104.5	C-6'	69	69.4
C-1'	95.5	95.5	C-6''	62.7	62.6
C-3''	78.0	77.9	C-2	34.9	34.9
C-5''	78.0	77.9	C-6	32.8	32.8
C-3'	77.8	77.7	C-4	30.1	30.1
C-5'	77.8	77.7	C-5	30.1	30.1
C-2''	75.1	75.0	C-3	25.6	25.6
C-2'	73.9	73.8	C-7	23.7	23.7
C-4''	71.5	71.4	C-8	14.5	14.4

3-2 NB11の単離と同定

化合物 **2** はノニジュースを HP20 カラムに通しその 25-50%メタノール画分を中圧カラムクロマト、HPLC、ゲルろ過により精製して得られた。

単離した化合物 **2** の分子量は ESI-MS により m/z 432 であることを確認し、¹³C-NMR スペクトルの比較では NB11 の報告値⁶⁾との詳細なデータの比較を行った。その結果(表 2)、今回ノニジュースから得られた化合物 **2** を NB11 と同定した。

4 まとめ

今回、ノニジュースから報告のある 2 成分の単離を試み、いずれの成分も報告どおり存在することを確認、NB10 を 22mg、NB11 を 140mg 精製することに成功した。今回の実験では NB10 精製のため 3 週間熟成されたジュースを用いたが、収量が非常に悪かった。NB10 は本来、新鮮なジュースから単離されておりこのジュース中の主要な成

分の一つである。新鮮なジュースを用いることが高収率化に重要であり、熟成過程での NB10 濃度の変化を確認することが必要だと考える。

表 2 化合物 **2** と NB11 の ¹³C-NMR データ比較表

	化合物 2	NB11		化合物 2	NB11
	δ C	δ C		δ C	δ C
C=O	172.8	173.2	C-6	75.5	75.7
C=O	171	171.2	C-2'	75.1	75.2
C-3	155.6	155.6	C-4'	71.7	71.9
C-8	146.1	146.2	C-10	64.0	64.1
C-7	132.1	132.2	C-6'	63.2	63.3
C-1'	101.4	101.3	C-9	46.4	46.6
C-1	100.7	100.9	C-5	42.6	42.8
C-5'	78.7	78.9	COCH ₃	21.0	21.1
C-3'	78.0	78.2			

謝辞

この研究は、平成 17 年度沖縄産学官共同研究推進事業として当該研究を財団法人亜熱帯総合研究所の委託により実施致しました。プロジェクトリーダー兼事業化推進リーダーの與那嶺安雄様 (株式会社海邦商事)、共同研究者の入福濱寿様 (株式会社海邦商事)、荻谷研一教授 (琉球大学大学院医学研究科)、また事務局としてお世話いただきました仲盛広明様 (亜熱帯総合研究所)、山本成様 (亜熱帯総合研究所) にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Mian-Ying Wang *et al. Acta Pharmacologica Sinica* **2002**, 23, 1127-1141, Johannes Seidemann *Pharmazeutische Zeitung* **2001**, 146, 36-40.
- 2) Chen X. Su *et al.* 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, March 13-17, 2005, C. Ancolio *et al. Phytotherapy Research* **2002**, 16, 646-649, Z.Zin *et al. Food Chemistry* **2002**, 78, 227-231, Mohd.Salleh *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 3693-3697, Anne Hirazumi *et al. Phytotherapy Research* **1999**, 13, 380-387.
- 3) Bao-Ning Su *et al. J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 592-595, Guor-Jien Wei *et al.* 222nd ACS National Meeting, Chicago, IL, United States, August 26-30, 2001, Shengmin Sang *et al.* 220th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, August 20-24, 2000, Mingfu Wang *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, 4880-4882, Oscar

Levand *et al. Planta Medica* **1979**, *36*, 186-7, Mala
Srivastava *et al. International Journal of Pharmacognosy*
1993, *31*, 182-184.

4) Kohei Kamiya *et al. Journal of Agricultural and Food
Chemistry* **2004**, *52*, 5843-5848, Eiichi Furusawa *et al.*
Phytotherapy Research **2003**, *17*, 1158-1164, Jonel P.Saludes
et al. Phytotherapy Research **2002**, *16*, 683-685, Shinya

Yamaguchi *et al. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*
2002, *49*, 624-627, Guangming Liu *et al. Cancer Research*
2001, *61*, 5749-5756.

5) Mingfu Wang *et al. J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1182-1183.

6) Mingfu Wang *et al. J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47*,
4880-488

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。