

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1報)

開発研究部 市場俊雄、喜屋武裕子

I. 概要

本研究は、天然の抗酸化物質の多目的利用を目的に、生産加工システム、すなわち、資源生物の探索から、抗酸化能増進、効率的抽出加工、製品化までの一貫した技術システムの開発を目指している。本研究では、琉球大学で行われた、沖縄特産の薬用植物エキスに関する調査結果を基に、沖縄で伝統的に用いられてきた薬用植物の中から、抗酸化作用の強い生物を選択し、抗酸化成分の安価で安定した抽出技術の確立を行い、さらに、多種多様な製品（食品素材、医薬品原料等を含む）製造に対応できる中間原料としての、製品の生産加工技術の開発を行うことを目的としている。

なお本研究は、新エネルギー・産業技術総合機構（NEDO）の行うベンチャーコンソーシアム研究開発事業で、下記の6グループによる産官学共同研究プロジェクトである。以下にこの構成とそれぞれの研究開発内容を示す。

- 琉球大学医学部
 - 安全性および薬理活性評価システムの開発
 - 抗酸化成分の簡便で確実な分析技術の確立
- 工業技術センター
 - 抗酸化成分の簡便で確実な分析技術の確立
 - 抗酸化成分の抽出・分析・同定
- 農業試験場
 - 原料選定及び安定供給に関する技術
- (株)沖縄発酵化学
 - 抗酸化成分の最適抽出法の開発
 - 抽出物の多目的利用を可能にする製品加工技術の開発
- (株)トロピカルテクノセンター
 - 抗酸化成分の最適抽出法の開発
 - 抽出物の多目的利用を可能にする製品加工技術の開発
- (株)仲善
 - 抽出物の多目的利用を可能にする製品加工技術の開発
 - 原料選定及び安定供給に関する技術

この中で工業技術センターは、主に分析に関する研究を担当し、平成10年度は、4種類の薬草の成分に関して分析方法の確立とその分析研究を中心に行ったので、以下に、研究内容とその結果を示す。

II. 実験材料及び実験方法

A. 実験材料及び装置

抗酸化試験試薬は、DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル 和光純薬)、Tris-HCl (シグマ TRIZMA pH7.4) を用い、テスト結果は、従来法では分光光度計UVIDEC-600 (日本分光) を、マイクロプレート法ではマイクロプレート (イワキ 96ウェルアッセイプレート 平底/丸底) とマイクロプレートリーダー ELX800 (バイオテックインストルメンツ社) を用いて吸光度を測定して求めた。

抽出実験及び成分研究に用いる薬草は(株)仲善または農業試験場で栽培・収集され、70℃の温風で乾燥した。粉碎にはK55粉碎機 (DITO SAMA社) を、溶媒抽出には高速自動抽出装置 ASE-200 (日本ダイオネクス) を使用した。

成分分析・分取には高速液体クロマトグラフィー (996アライアンス、ウォーターズ) を用い、カラムは分析にSymmetryC18またはSymmetryC8の4.6mm x 100mm (ウォーターズ) を、分取には19mm x 150mmまたは8mm x 300mm (ウォーターズ) を用いた。分取HPLCの前処理としての粗分離は、合成樹脂DIAION HP20 (三菱化学) により行った。

分取した成分の構造決定では、核磁気共鳴測定装置 Lambda400 (日本電子) 及び、質量分析装置 JMS-700 (日本電子) を用いた。LC-MS分析は、上記高速液体クロマトグラフィー装置 (996アライアンス) と質量分析装置 (JMS-700) を組み合わせて行った。

B. 実験方法

1. 抗酸化試験 (従来法)

a 試薬の調製

1 mMのDPPH(分子量34)をエタノールに溶かし、それを10倍希釈 (エタノール) して (即ち0.1mM) 用いる。[DPPH 3.9mgを50mLのビーカーに入れ10mLのエタノールを加えスターラーで攪拌 (パラフィルムでふたをする)]

b 反応

0.05mMのTris-HCl (pH7.4) 0.95mL

0.1mMのDPPH 1.0mL

EtOHを1.0mL

以上を試験管に入れる

c 結果の出し方

上記の試験管に薬草エキス0.05mLを入れ30秒後のOD517を測定する。

薬草エキスを加える前 (減少率0%) と後の吸光度を比較して薬草エキスの抗酸化性 (減少率を0~100%で表現) を判断する。一般に50%以上減少させた場合に抗酸化性があったと判断する。

2. 抗酸化試験法 (マイクロプレートリーダー法)

a 試薬の調製

0.75mMのDPPHをエタノールに溶かして用いる。[DPPH 15mgに50mLのエタノールを加えスターラーで攪拌]

b 反応

エタノール 0.05mL

薬草エキス 0.05mL

以上をマイクロプレートのウェルに入れる

c 結果の出し方

上記のウェルに0.75mMのDPPH 0.05mLを入れ20分後のOD515を測定する。

従来法同様、薬草エキスを加える前（減少率0%）と後の吸光度を比較して薬草エキスの抗酸化性（減少率を0～100%で表現）を判断する。

C. 成分抽出条件検討法

1. 試料調製

a 乾燥グァバ葉を粉碎機により徹底的に粉碎した。

b 試料5gを抽出用試料としてASE-200用33mL抽出槽に充填した。

2. 抽出

ASE-200溶媒抽出装置を用いて、下記の条件を検討した。

a 抽出回数

回数を1回から10回まで変化させて抽出物を得た。1回の抽出操作はエタノール/水1:1で、10分間行った。

5gのサンプルを50mLのエタノール/水1:1で20分間ずつ抽出し、抽出液4mL中の収量とその抗酸化活性を測定した。

活性は、0.1mMのDPPH溶液の吸光度を50%減少させるのに必要なエキスの濃度で表した。エキスの濃度は、抽出物の希釈倍率で表した。

b 抽出温度、時間、溶媒

抽出回数は、3条件ともに2回に設定した。抽出温度は、室温（約25℃）とその溶媒の沸点付近（エタノール78℃、エタノール/水1:184℃、水100℃）の2段階でおこない、抽出時間は10分と180分の2段階で違いを検討した。溶媒では、製品製造時の安全性・コスト・取り扱いやすさ・抽出効率等を総合的に判断し、エタノール、エタノール/水1:1、水の3種類を検討した。

D. 薬草の抗酸化有効成分の単離法

1. グァバ

(株)仲善から入手したグァバの葉60gを、エタノール300mLで5日間抽出した。抽出物は、減圧濃縮後n-ブタノールと水で分液し、抗酸化活性を示したブタノール相を減圧濃縮して、活性抽出物7.5gを得た。

まず、活性抽出物は10%メタノールに懸濁したのち、カラムに充填したHP20に吸着させ、水/メタノールで段階的に溶出し、それぞれの画分の活性試験を行った。画分のうち60%メタノール溶出画分にもっとも強い活性が見られたため、この画分をHPLCにより精製し、活性化合物1～6を単離した。分離スキームを図1に示す。単離した化合物はそれぞれ活性試験を行った。

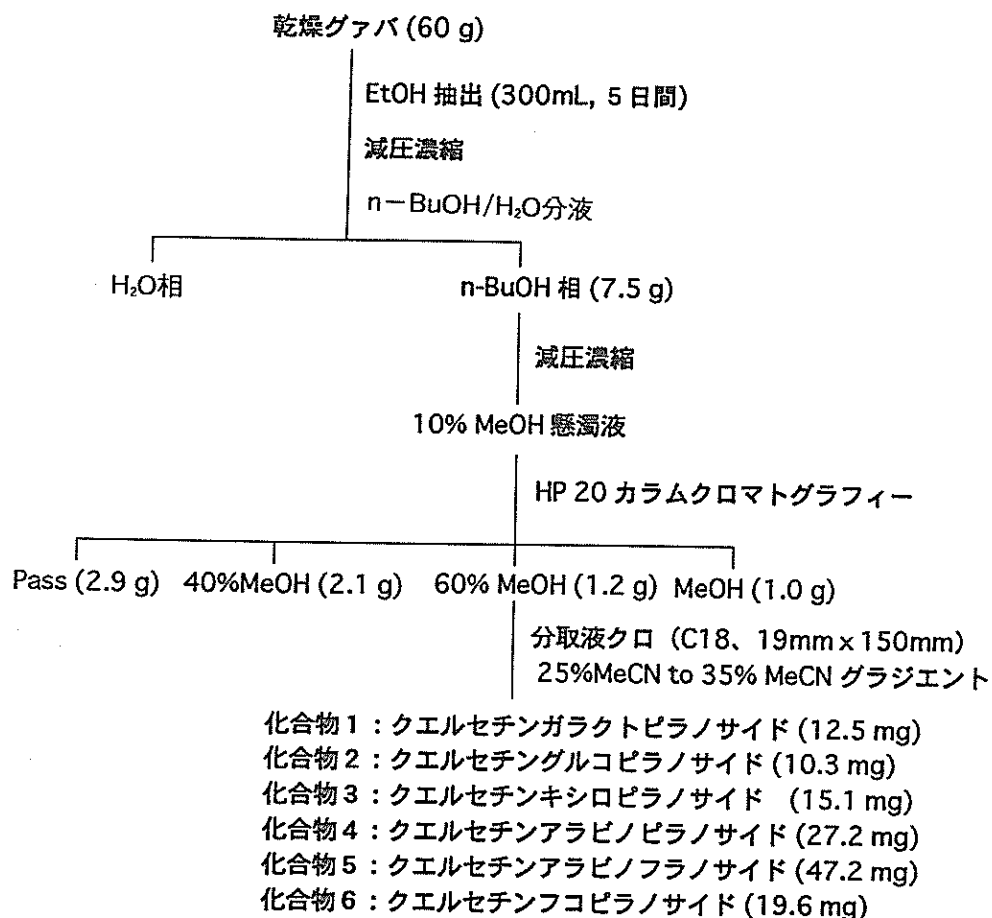


図1 グアバエキス分離スキーム

2. リュウキュウヨモギ

(株)仲善から入手したリュウキュウヨモギの葉600gを、エタノール5Lで3回抽出した。抽出液は減圧濃縮し16.1gのエキスを得た。

まず、活性抽出エキスは20%メタノールに懸濁させた後、HP20のカラムに吸着させ、水/メタノールで段階的に溶出し、それぞれの画分の活性試験を行った。画分のうち60~100%メタノール溶出画分にもっとも強い活性が見られたため、この画分(2.7g)をC18オープンカラムにより更に分離した後、HPLCにより最終的に精製を行い、化合物7~13を単離した。分離スキームを図2に示す。単離した化合物はそれぞれ活性試験を行った。

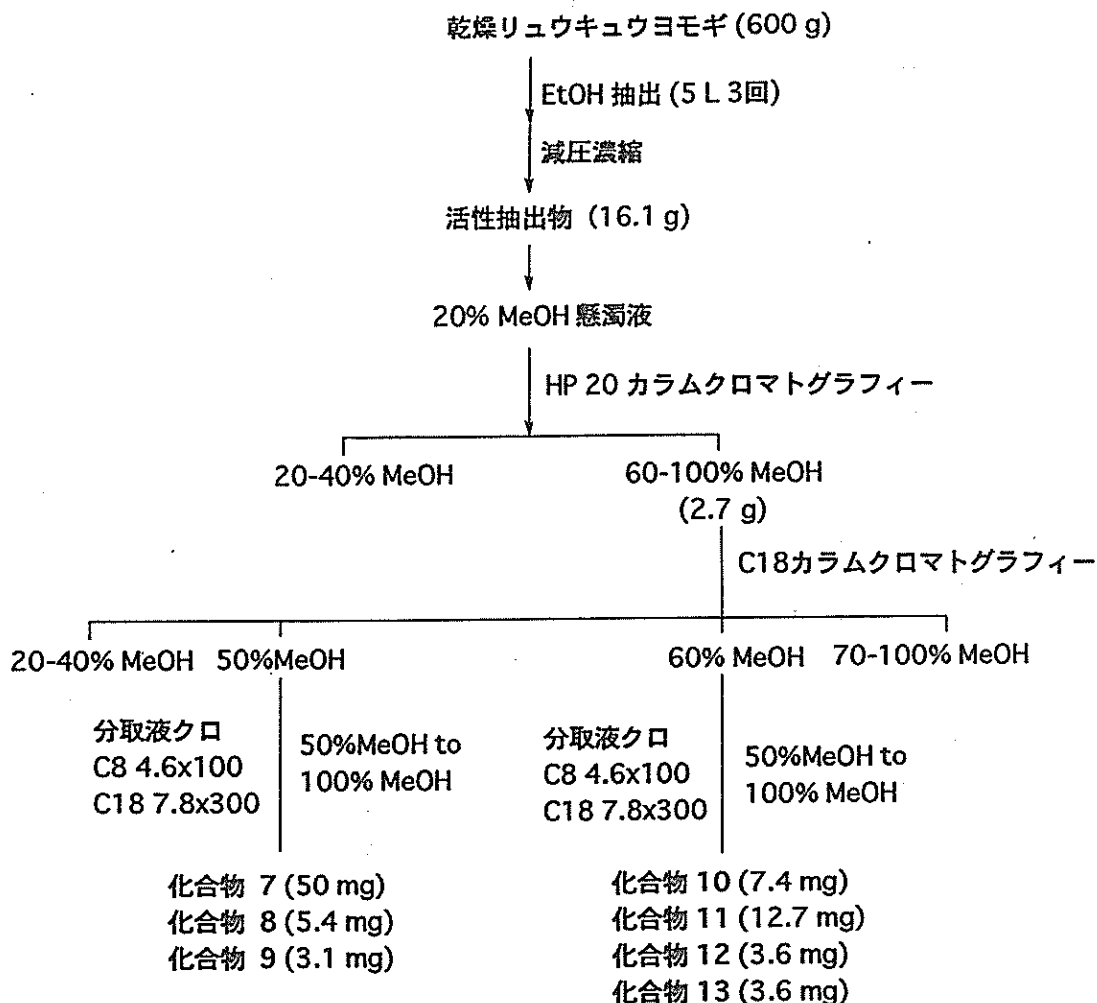


図2 リュウキュウヨモギエキス分離スキーム

3. ニシヨモギ

(株)仲善から入手したニシヨモギの葉10gづつを、ASE-200用抽出槽3本に充填し熱エタノール25mLで90分づつ2回抽出し、その後水/エタノール1:1 25mlで同様に抽出を行った。水/エタノール1:1抽出物が強い抗酸化性を示したため、これを活性抽出液とした。

まず、活性抽出エキスはHP20のカラムに吸着させ、水/メタノールで段階的に溶出し、それぞれの画分の活性試験を行った。HP20画分のうち75%メタノール溶出画分にもっとも強い活性が見られたため、この画分をHPLCにより精製し、化合物14、15を化合物2と共に単離した。分離スキームを図3に示す。

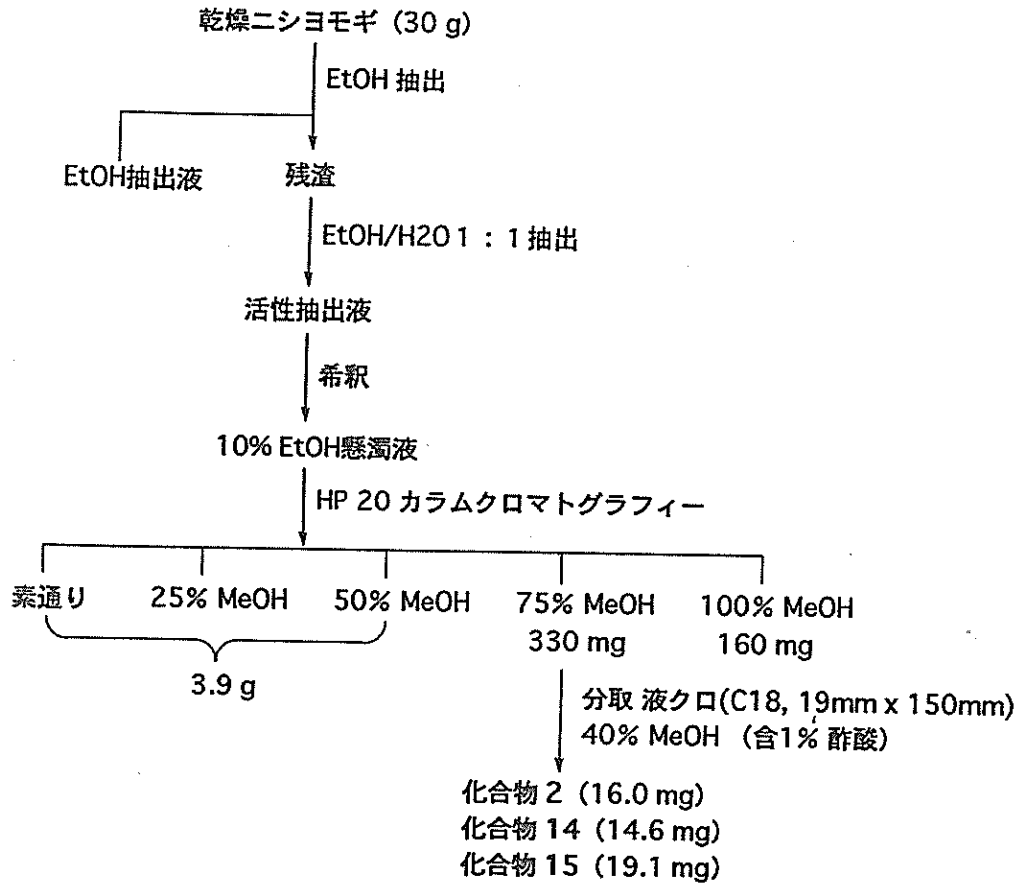


図3 ニシヨモギエキス分離スキーム

4. オオイタビ

農業試験場から入手したオオイタビの葉10gづつを、ASE-200用抽出槽6本に充填し熱エタノール25mlで10分づつ2回抽出し、その後熱水25mlで同様に抽出を行った。抽出物は同程度の抗酸化性を示したため、合わせてオオイタビ活性抽出液とした。

まず、活性抽出エキスは水で約3倍に希釈し懸濁液とした後、HP20のカラムに吸着させ、水/メタノールで段階的に溶出し、それぞれの画分の活性試験を行った。HP20画分のうち50%および75%メタノール溶出画分にもっとも強い活性が見られたため、この画分をHPLCにより精製し、化合物16と17を単離した。分離スキームを図4に示す。

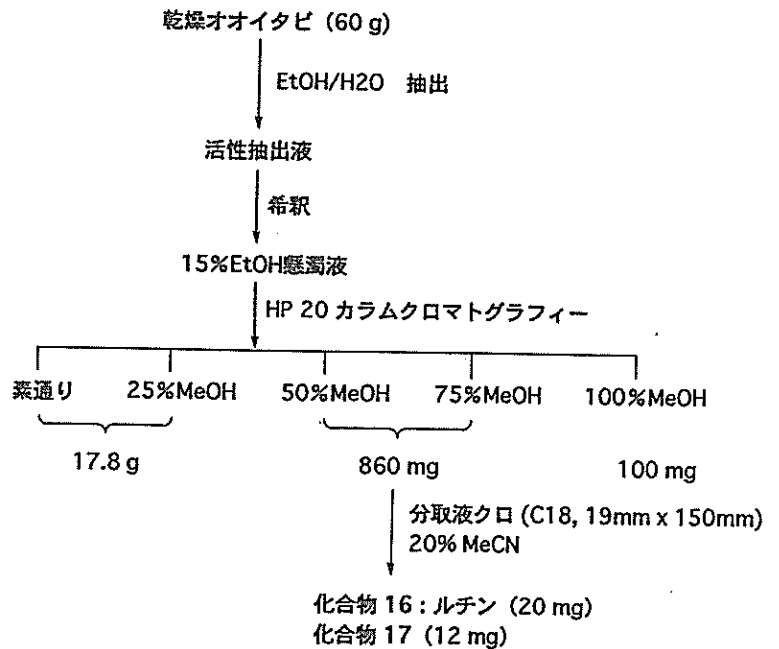


図4 オオイタビエキス分離スキーム

III. 結果及び考察

A. 抗酸化試験法の検討結果

これまで数多くの抗酸化試験法、試薬が開発されているが、その中で、薬草のエキスをスクリーニングし、また、成分の分離精製に使用する方法としてDPPHによるものを選択した。DPPH抗酸化試験は、

- 1 1種類の試薬でテストが行え、操作が単純である
- 2 結果が出るまでの時間が短い
- 3 検出が分光光度計で行え、その検出が薬草エキスの影響を受け難い

といった特徴がある。

従来のDPPHによる抗酸化試験は、試験管や、一般の分光光度計を用いてテストを行っており、この方法では、試料がかなりたくさん必要なことと、多数の検体を処理することが困難であった。これは、数多くの薬草エキスをテストする場合や、分離精製過程において数多くの分画面分の抗酸化試験を行う場合、非常に作業効率を悪くする。そこで今回マイクロプレートリーダーを用いた抗酸化試験を考案、試行した。この試験方法は、

- 1 コンベンショナルなテスト方法がそのまま応用できるため、信頼性、簡便性は全く損なわれない
- 2 試験管を用いた従来法に比べて20分の1の試料、溶媒、試薬量で全く同様の結果が得られる
- 3 96ウェルタイプのマイクロプレートを用いることにより、従来1回1試料のテストが、1回で96試料が同時にテストできるようになる

といった特徴がある。

次にDPPH/マイクロプレート法検討結果について述べる。従来のDPPH法では、テスト効率（検体数）を上げるため、反応時間を短くし、また試料の無駄を無くすために試料及びDPPH濃度を薄くしていた。しかしこの場合、1試料あたり30秒の反応時間を必要とし、この時間の正確さがテスト結果に非常に大きな誤差を与え、またDPPH濃度が薄いためテストウィンドウ、すなわち(OD515=0.25) 定量範囲が狭く、測定の誤差が大きいという欠点があった(最大10%程度)。そこでDPPH濃度を高くし、反応時間を延ばしてプレートリーダーによる測定を行うことで測定誤差を小さくし多検体処理を可能にした。DPPH/マイクロプレート法と従来法の特徴を表1にまとめた。明らかにDPPH/マイクロプレート法は、感度、実験誤差、実験時間の点において従来法よりすぐれている。

表1 DPPHによる抗酸化テストの比較

	必要なテスト溶液	テストウィンドウ	誤差	処理時間
DPPH/マイクロプレート法	0.15ml	1.2	>3%	0.3秒/試料
従来法	3ml	0.2	>10%	30秒/試料

さらに、相対的なDPPH溶液の退色により現していた活性を、消去されたDPPHラジカルの絶対量で現すことにより、異なった試料間での抗酸化活性の比較を容易に行えるようにした。

また、マイクロプレートリーダーにより読み取った結果は、Microsoft Excelにより表計算マクロを作成し、結果を数値化できるようにしたことで、誰にでも正確な結果が容易に出せるようになった。

B. 抽出条件の検討結果

抽出条件の選択は、実用化する場合のコスト、安全性、操作性等を考慮し以下の観点から検討を試みた。すべての抽出において再現性が非常に重要な要素となっているため、人為的な実験誤差を最小限に押さえるため、自動高速溶媒抽出装置と抽出槽（33ml）を用いた。

1. 抽出回数

各々の抽出で得られた抽出物の量と活性の関係を図5に示した。この結果から、2回の抽出で90%以上のものが抽出されていることがわかる。また、抽出物の重量と活性の強さには相関がある。さらに、抽出の効率を評価するために、抽出物の重量と比活性（活性を重量で割ったグラム当たりの活性）の関係を調べた（図6）。この関係から、抽出物の量で抽出の効率が判断できることがわかり、活性化化合物の抽出も最初の2回で充分であることが確認された。

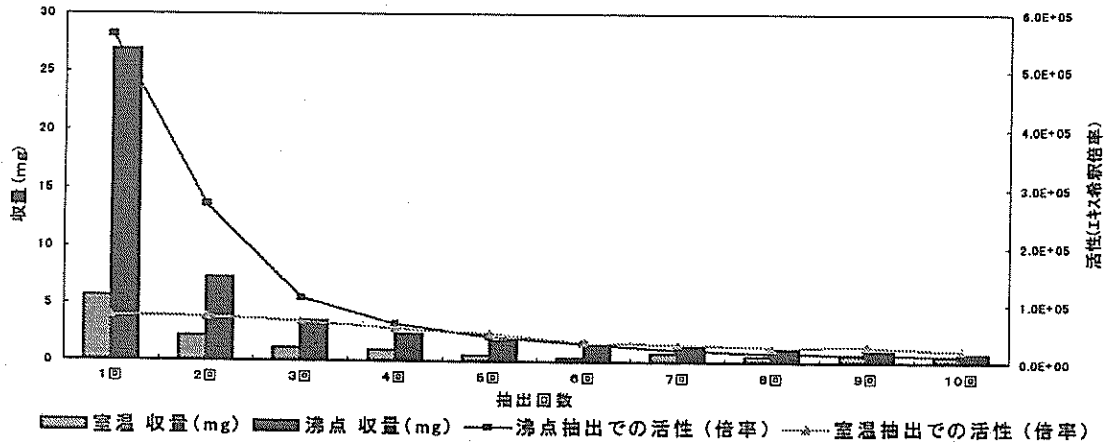


図5 抽出物の重量と活性の比較

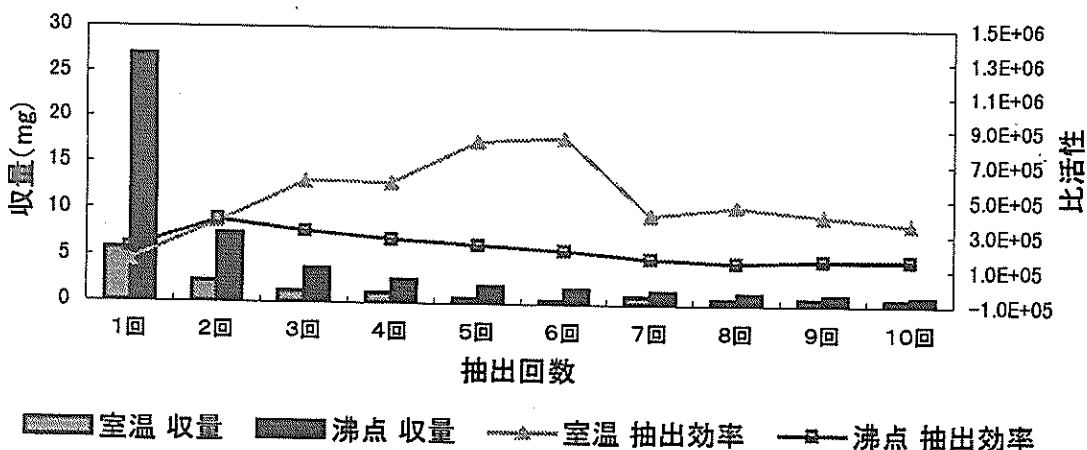


図6 抽出物と比活性の比較

2. 抽出温度、時間、溶媒

上の実験において、効率的には2回の抽出で十分と思われたので、抽出回数を2回に固定

して、温度、時間、溶媒をそれぞれ検討した。図7に各種抽出溶媒による抽出効率を、比活性としてグラフ化した。この結果、抽出温度は室温に比べて沸点付近のほうが倍近い効率であることがわかった。一方抽出時間は、抽出効率に余り影響を与えていない。抽出効率に最も影響あるのは溶媒である。エタノール抽出と水抽出は、ほぼ同程度の効率であったが、エタノール/水1:1では、その2倍近い抽出物が得られ、比活性もそれに比例している。また、エタノール/水1:1で得られた抽出物は、エタノール抽出物と水抽出物を合わせた量にはほぼ相当することから、エタノール/水1:1では、エタノールによる比較的低極性のものから、水で抽出される高極性のものまでの幅広い抽出が行えるものと思われる。

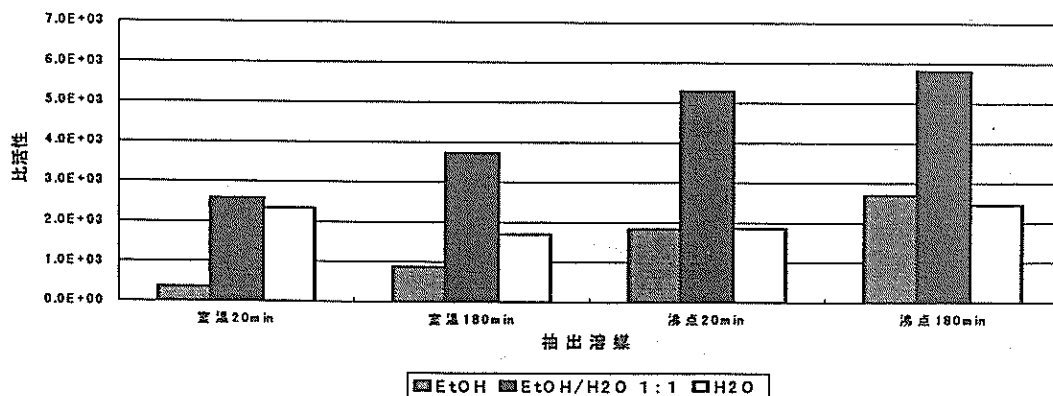


図7 各種抽出条件における比活性

C. 成分分離・構造決定

1. グアバ

a 構造決定

最終的に活性化合物は分取液クロで精製し6個の化合物(化合物1~6)を得た。単離された6個の化合物は、その紫外吸収スペクトル(図8)とLC-MS (APCI-MS、フラ

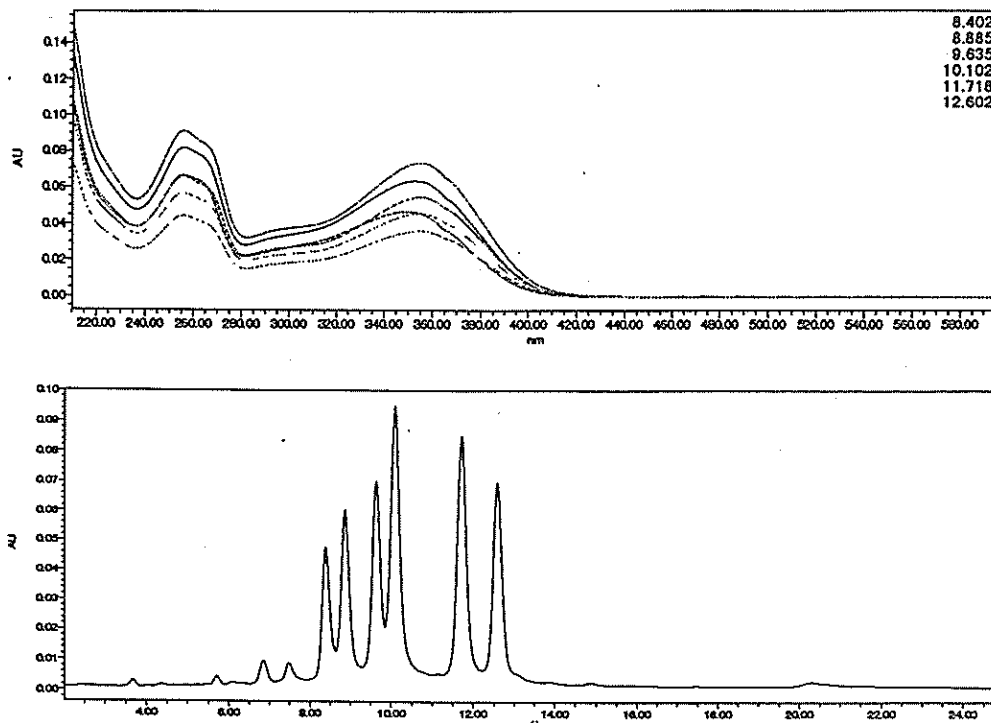
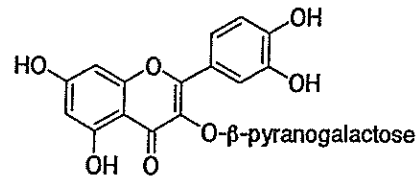


図8 グアバから単離された6化合物の紫外線吸収スペクトルとクロマトグラム

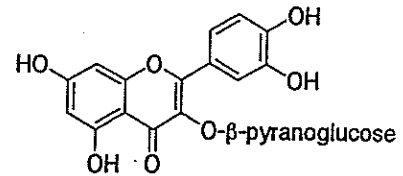
グメントイオン m/z 304) より同じ発色団を持つことが示唆された。

NMRスペクトル (^1H 、 ^{13}C 、DEPT、COSY、HMQC、HMBC) の解析により、すべての化合物はクエルセチン部分をもつことが分かった。さらにMSの分子イオンピークと、上記NMRスペク

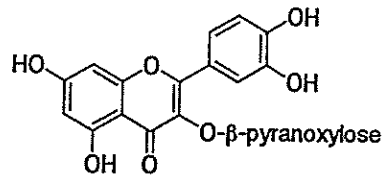
トルデータの詳細な解析と、データの文献値^{1),2)}との比較により、化合物1~6は、クエルセチンのC3位にそれぞれガラクトース、グルコース、キシロース、アラビノース(ピラノース型)、アラビノース(フラノース型)、ラムノースのついたフラボノイド配糖体であると決定した(図9)。



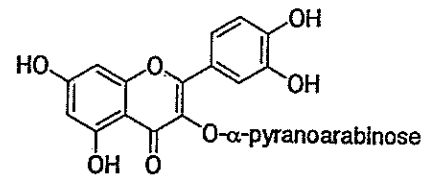
化合物1



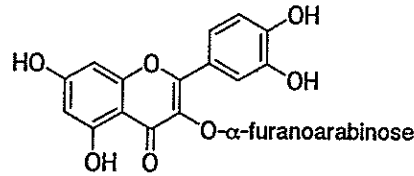
化合物2



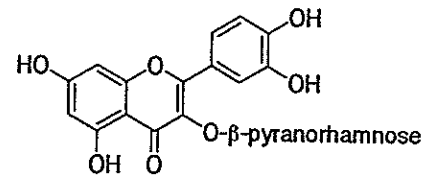
化合物3



化合物4



化合物5



化合物6

図9 グァバから単離されたクエルセチン配糖体

b 単離した成分のDPPH抗酸化活性試験

DPPHによる抗酸化試験を、単離した6個の化合物について行った(表2)。

表2 グァバのブタノールエキス及び単離された化合物の抗酸化活

単位	BuOH エキス	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5	化合物 6
μg (サンプル重量)	8.8	7.3	7.2	7.1	7.4	7.4	9.1

DPPH 1 μmol のラジカルを消去するのに必要なサンプルの量

活性試験の結果、化合物1~6は同程度の活性を示し、糖の種類が活性に関与していないことを示している。また単離された化合物とエキスの間、活性の優位な差が見られなかった。このエキスの大部分がタンニン類であることが、トロピカルテクノセンターの研究により明らかにされており、これはタンニン類を含めてポリフェノール類が同程度の抗酸化活性を有することを示唆している。

2. リュウキュウヨモギ

a 単離した成分の構造決定

活性化合物7は、C18オープンカラム精製により結晶として得られ、 ^1H および ^{13}C -NMR

スペクトルの文献値³⁾とのデータの比較により、クマリン誘導体ヘルニアリンであることが分かった。化合物9と10は、¹H、¹³C、DEPT、COSY、HMQC、HMBCより、フラボン骨格を持ち、また化合物8はそのジヒドロ体であることが示唆された。そこでこれらの化合物のNMRデータを文献値^{4), 5)}と比較したところ化合物8~10はそれぞれエリオディクチオール、ラムネチン、ユーバトリチンであると決定した(図10)。

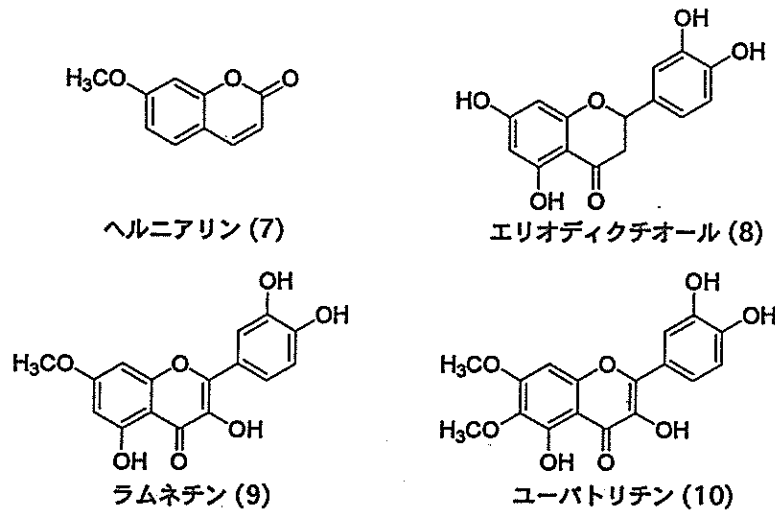


図10 リュウキュウヨモギから単離・固定されたクマリンおよびフラボン類

さらに化合物11~13についてもNMRスペクトルデータの詳細な解析を行い、それぞれキャピラリシン(11)、2-(パラヒドロキシフェノキシ)-5,7-ジヒドロキシクロモン(12)、2-(パラヒドロキシフェノキシ)-5,6,7-トリヒドロキシクロモン(13)であると推定した。それぞれの化合物は、文献値⁶⁾とその各種スペクトルデータを比較して最終的に構造を決定した(図11)。

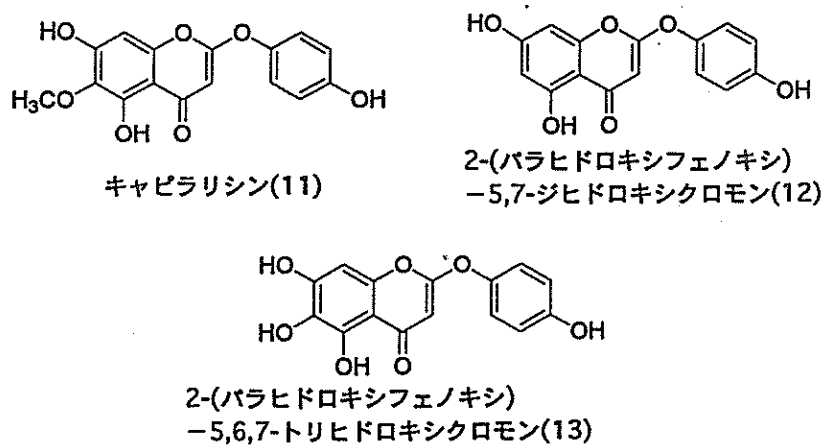


図11 リュウキュウヨモギから単離・同定されたクロモン類

b 単離した成分のDPPH抗酸化活性試験

DPPHによる抗酸化試験を、単離した7化合物について行った(表3)。この結果、興味深いことに芳香族環上に1,2ジヒドロキシ部分を有するもの(8, 9, 10, 13)のみに抗酸化活性がみられた。このことはDPPHによる抗酸化活性を示すのに、この部分構造が重要であることを示している。

表3 リュウキュウヨモギから単離された化合物の抗酸化活性

単位	化合物 7	化合物 8	化合物 9	化合物 10	化合物 11	化合物 12	化合物 13
μg (サンプル重量)	>1600	15.9	10.6	17.9	>1600	>1600	29.3

DPPH1 μmolのラジカルを消去するのに必要なサンプルの量

3. ニシヨモギ

a 単離した成分の構造決定

活性化合物として分取液クロで精製し3個の化合物を得た。単離された化合物のうち2つ(14と15)は、そのUVスペクトル、LC-MS (APCI-MS)、¹H-NMRより同じ発色団を持つことが示唆された。

一方、もう一つの化合物は、14と15とは全く違う種類の化合物であることがLC-MS (APCI-MS) より示唆され、¹H-NMRよりフラボン骨格であることが予測されたため、この化合物のNMRスペクトルをグァバから単離されたクエルセチンの一連の配糖体と比較したところ、グルコース配糖体、化合物2であることが分かった。

一方、化合物14と15は、現在構造決定中であるが、¹Hおよび¹³C-NMRスペクトルの検討からカフェイン酸誘導体(図12)であることが予想される。

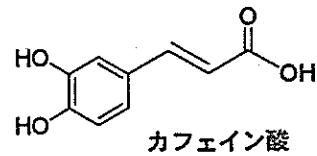


図12 カフェイン酸の構造

4. オオイタビ

a 単離した成分の構造決定

活性化合物16と17が分取液体クロマトグラフィーで精製することにより得られた。化合物16は、LC-MS (APCI) より(図13)クエルセチンに糖が2個ついた化合物であるこ

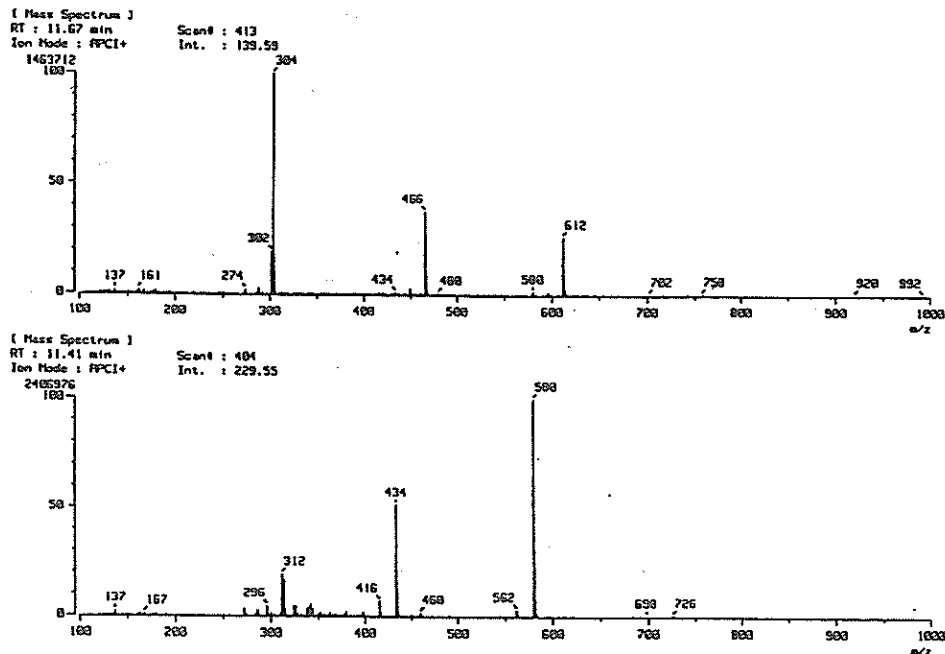


図13 化合物16(上)と化合物(下)のマスペクトル

とが予想された。そこで¹Hおよび¹³C-NMRスペクトルをルチン標品のスペクトルと直接比較し、ルチンであると同定した(図14)。一方、化合物17は、NMRスペクトル(¹H、

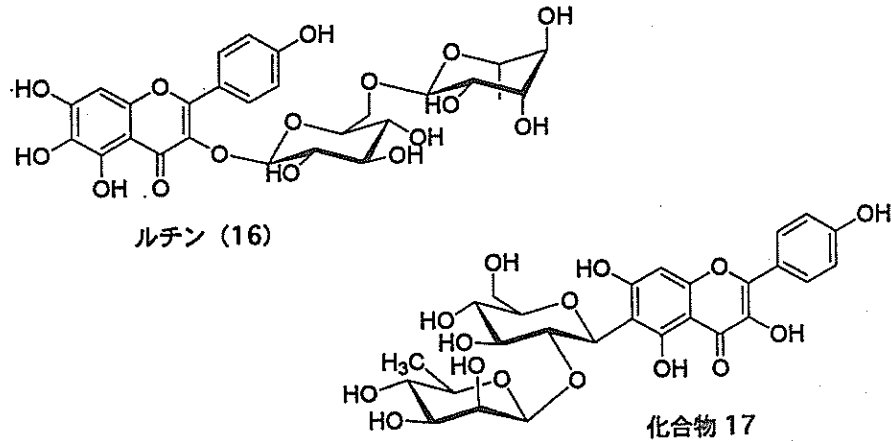


図14 オオイタビから得られた化合物

¹³C、DEPT、COSY、HMQC、HMBC)の解析と、それらデータの文献値^{1)、2)}との比較とにより、アピゲニンの配糖体であることが分かった。さらにMSの分子イオンピーク(m/z 580)と、上記NMRスペクトルデータの詳細な解析により、化合物17は、図14に示す、アピゲニンのC 5位に直接グルコースが置換し、そのグルコースの2位にラムノースがついたフラボノイド配糖体であると推定した。

IV. 結 言

今回開発した、DPPHマイクロプレート法により、従来のDPPHによる、抗酸化試験の特徴をまったく損ねることなく、少量の試料で、同時に多数の試料の抗酸化試験が可能になった。これにより、抗酸化活性を指標とした活性成分の分析、単離の効率が大幅に向上した。

グァバを用いた抽出試験の結果、エタノール/水1:1の混合溶媒による抽出が非常に効率が良かったことが分かった。さらに、抽出回数、抽出温度、抽出時間に関する実験より、抽出は最初の1-2回でほとんどのものを抽出でき、短時間抽出溶媒で還流するのが最も効率が良いことも分かった。グァバをはじめとして、リュウキュウヨモギ、オオイタビ、ニシヨモギなどはいずれもフラボノイドまたはその配糖体が活性成分であるため、抽出において同様の条件が適用できるものと思われる。

成分分析において、グァバから6種、リュウキュウヨモギから7種、ニシヨモギから3種、オオイタビから1種の化合物を単離しそれらの構造を決定または推定した。今後この分析法および単離構造決定の結果を整理検討することにより、体系的な薬草成分の分析法を確立する必要がある。

本研究開発は、緒言でも述べたように、新エネルギー・産業技術総合機構(NEDO)の研究開発支援事業である地域コンソーシアム研究開発制度に提案し、平成10年度の事業として採択され、共同研究「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」の分担課題として実施しているものである。研究期間は2年間で、本報告は、初年度の研究成果をまとめたものである。

V. 謝 辞

本研究を実施するに当たってご助言をいただきました、國府田佳弘博士、屋宏典博士、アドバイザーとして当研究にご参加いただきました九州工業技術研究所材料化学部安田誠二部長に深く感謝いたします。また、小山智之研究員、山本尚美研究員を派遣していただいた(株)沖繩発酵化学にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Hans-Otto Kalinowski, Stefan Berger, and Siegmur Braun著, Carbon-13 NMR Spectroscopy, John Wiley & Sons.
- 2) Eberhard Breitmaier and Wolfgang Voelter著, Carbon-13 NMR Spectroscopy (High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry), VCH.
- 3) N. J. Cussana and T. N. Huckerby, Tetrahedron, 1975, 31, 2719-2726.
- 4) Amir Sharon, Rodolfo Ghirlando, and Jonathan Gressel, Plant Physiol., 1992, 98, 303-308.
- 5) Takeya Komiya, Makoto Tsukui, and Haruji Oshio, Chem, Pharm, Bull., 1975, 23, 1387-1388.
- 6) James N. Roitmen and Lynn F. James, Phytochemistry, 1985, 24, 835-848.

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。