

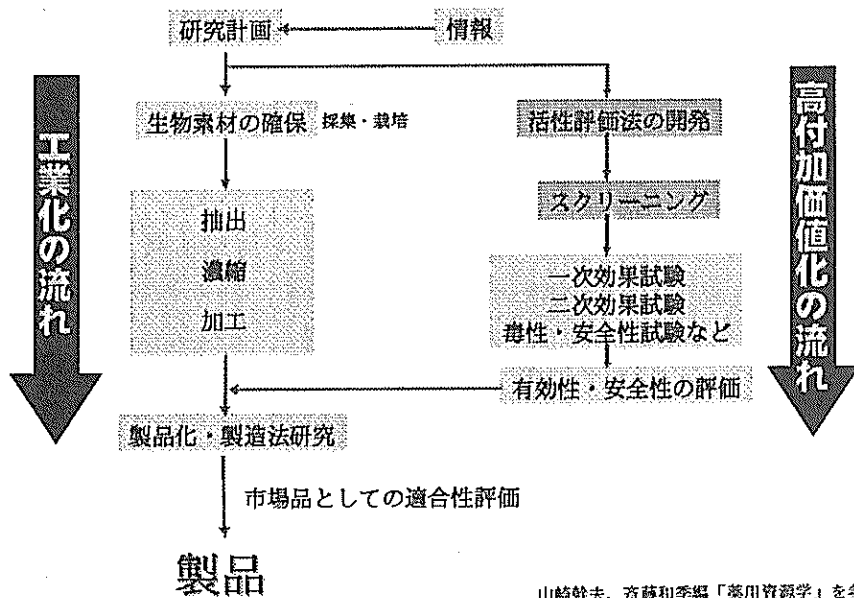
有用生物資源の多目的利用のための加工製造システムの研究開発（第2報）

研究開発部 市場 俊雄、喜屋武 裕子

研究開発の概要

本研究では昨年度¹⁾に引き続き、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、資源生物の開拓から、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研究を行なった。

当該研究におけるシステム開発においては図1に示すように加工製造に関する研究開発の流れと、効能など製品の高付加価値化に関する研究開発の流れを平行して行なう必要があった。また、今後、薬草製品を工業原料としていくためには、この2本の流れと共に薬草材料の栽培法等に関する検討も重要であるため、最適栽培技術の確立にも力点を置いた研究開発を行なった。



山崎幹夫、斉藤和季編「薬用資源学」を参照

図1 天然資源開発システムの概要

本事業では、図1に示される一般的な天然生物資源開発の各ステップを、6グループによるコンソーシアム方式で行ない、それぞれのステップをシステム化し効率よく研究を行ない、それぞれの成果を有機的に結びつけることで大きな生産システムを完成させた。「情報」に関しては、本事業に先立って行われた沖縄県内の抗酸化薬草バイオマスに関する調査研究をもとにした。まず琉球大学では、DPPHラジカル、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシドラジカルの *in vitro* での消去活性を利用し抗酸化能を試験し、さらにマウスとラットを用い *in vivo* で血糖降下、血圧上昇抑制、利尿作用、肝保護作用などを実際に生体内でテストし抗酸化能を有する一次製品の評価を行なうことができる方法を確立した。

沖縄県工業技術センターでは、抗酸化成分の分析を高速液体クロマトグラフィーとDPPH抗酸

化試験を組み合わせ、抗酸化成分の迅速な分析技術の確立を行なった。

本事業での最も重要な研究課題の一つである原料の安定供給に関しては、栽培と流通品の利用に関して（株）仲善と沖縄県農業試験場が、また、抗酸化有効成分の安価で安定した成分抽出技術の確立を目指して（株）沖縄発酵化学と（株）トロピカルテクノセンターが現有の工場施設を用い、工業生産を目標に研究開発を行なった。

今回の研究開発事業は、実質1.5年という短期間で行なったが、琉球大学と沖縄県工業技術センターが確立した成分分析法、特にDPPH/マイクロプレート法による抗酸化能評価技術の確立の成功が、栽培技術の確立、抽出技術の確立、および加工製造システムの開発を行なう効率を大幅にアップし、本研究開発を成功させる鍵となった。

本研究開発は以下の8項目に分かれた研究を各分担者が実施し、定期的な委員会で研究内容を調整する方法で進めた。

1. 研究用薬草の栽培と安定供給（仲善、農業試験場）
2. 薬草の栽培条件の最適化（琉球大学、農業試験場、工業技術センター）
3. 抗酸化能の迅速、簡便な評価方法の確立（工業技術センター、琉球大学）
4. 抗酸化成分の単離、同定（工業技術センター）
5. 薬草のラジカル消去活性の評価（琉球大学、工業技術センター）
6. 薬草の薬理作用、安全性の評価（琉球大学）
7. 抗酸化成分の効率的抽出法の検討（工業技術センター、トロピカルテクノセンター、沖縄発酵化学）
8. 抗酸化成分の乾燥、粉末、顆粒化条件の検討（トロピカルテクノセンター、沖縄発酵化学、仲善）

この研究分担に従い、各研究機関が研究を行なった。その結果、最適栽培条件の確立、抗酸化成分分析技術の確立、抗酸化能評価技術の確立、抗酸化能エキス中間製品の製造技術の確立がそれぞれ完結し、最終的にこれら確立された個々の技術をシステム化することに成功した（図2）。

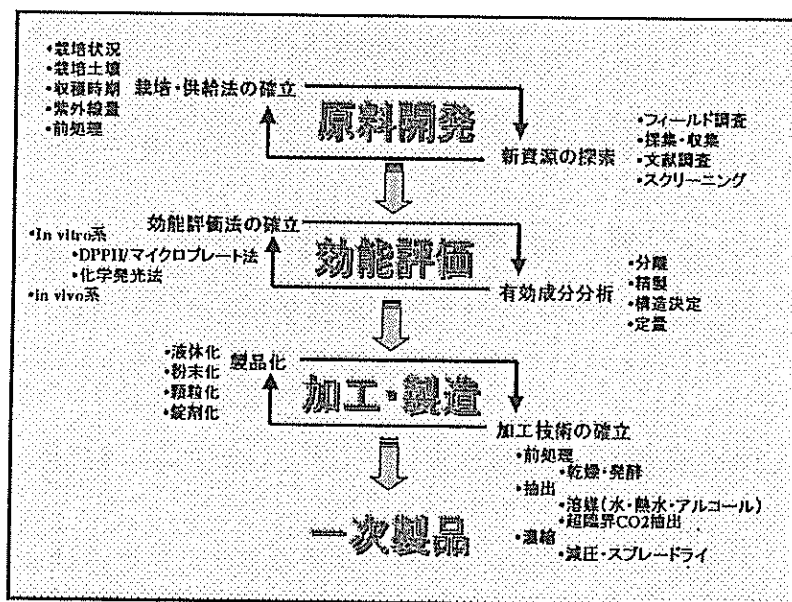


図2 今回の研究開発システム

この生産システムの機能を確認する目的で、薬草を用いた具体的な中間製品の製造を行なった。薬草としては当初から製品化を目指していたグアバ、リュウキュウヨモギ、ボタンボウフウを用い、本研究で開発した加工システムに従い液体、粉末、錠剤の各製品を生産した。その結果、いずれの製品も充分商品となりうる製品ができた。

上記の特定の薬草をモデルに本製造システム開発を行なったが、この加工システムは多くの天然生物資源の抗酸化一次製品の原料製造に活用できると考えられる。特に、乾燥、抽出、濃縮の工程は、試料の特性に応じて柔軟に対応できるよう設計されており、大規模な工場での固定化された生産ラインでは困難な、柔軟性、応用性に富む中規模な生産ラインである点が、県内の中小企業のニーズに良く適合したものであると思われる。さらに、今回のシステム開発研究の手順は、微生物、海洋生物、動物など多くの特徴的な天然生物資源を利用した、高付加価値製品の県内での開発に指針を与えると思われる。

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11年度は、栽培条件による薬草の抗酸化能の違いに関する研究と、3種類の薬草の抗酸化成分に関して研究を行なったので以下にその内容と結果を報告する。

第1部 沖縄産薬草の栽培条件による抗酸化能の違いに関する研究

A. はじめに

薬草を工業原料として利用する場合、そこに含まれる有用成分が一定の含量存在することが重要である。しかしながら多くの植物は、栽培の方法や収穫時期などにより含まれる有用成分の含量が変動し、成分含量の安定した製品を製造することが困難な場合が多い。そこでいくつかの薬草について、栽培条件が抗酸化成分に与える影響を調べて、今後の薬草栽培において留意すべき点の指針を得ることを試みた。

沖縄本島を構成する土壌は、土質の違いにより大きく3つのタイプがある。本研究ではまず、これら3タイプの土壌（本島北部地域の国頭マージ、本島中部地域のジャーガル、本島南部地域の島尻マージ）で栽培された薬草の抗酸化活性を調べ、その抗酸化能に違いがあるかどうかを検討した。

次に紫外線が有効成分の含量に与える影響を見るため、数種類の薬草を自然日照下で栽培したものと、紫外線カットフィルムを張ったハウス内で栽培したものとに分け、それぞれの薬草抽出エキスの抗酸化能を調べた。これは、紫外線の強い地域の植物が、紫外線による酸化ストレスを強く受け抗酸化機構を備えて生体を護っており、その植物は抗酸化物質を多く含んでいるものと推察され、沖縄産の薬草にその傾向が強いことが考えられるからである。

これまでの沖縄産薬草のスクリーニングにおいて、多くの薬草で栽培された季節によって抗酸化作用に違いがある傾向が見られた。そこで、3点目の検討課題として、本研究では季節をずらして6種の薬草を栽培し、その抽出エキスの抗酸化能を、DPPHラジカル消去活性(EC_{50})により評価し、その抗酸化能に違いがあるかどうかを検討した。

B. 方法

1. 薬草の栽培と前処理

全ての薬草は、農業試験場具志川園芸支場の管理圃場で上記3土壌の栽培区画を作成し平成11年3月から12月の間栽培した。栽培および抽出試験はニシヨモギ、リュウキュウヨモギ、カラヲヨモギ、オトコヨモギ、ボタンボウフウ、ベニバナボロギクの6種の薬草に関して行なった。

2. 薬草抽出エキスの調整

各薬草は農業試験場で70℃で温風乾燥後、フードプロセッサーにより粉末化されたものを使用した。抽出には高速溶媒抽出装置ASE 200を用いた。

抽出する試料5gをセライト5gと良く混ぜ合わせ、33mL抽出セルに充填し、抽出溶剤エタノール/水 1:1、抽出圧力2000psi、抽出温度84℃、抽出時間10分、抽出回数2回、ページボリュウム50%、ページ時間120秒で抽出を行った。

得られた抽出エキス(45~50mL)はすべて50mLに調整、振とう後、2500rpmで10分間遠心分離した。その上清2mLを4mLのサンプルバイアルに採り、遠心エバポレーターで乾固後計量し、正確に5mg/mLになるようジメチルスルホキサイド/水 1:1を加えた。その後、超音波洗浄機およびボルテックスミキサーにより完全にエキスを溶解・均質化して、DPPHラジカル消去活性試験のための抽出エキス調整を行なった。

3. DPPHラジカル消去活性の検討

薬草抽出エキスのDPPHラジカル消去活性はDPPH/マイクロプレート法により行なった。¹⁾

C. 結果と考察

1. 栽培土壌による抗酸化能の違い

DPPHラジカル消去試験の結果を図3~8に示した。栽培はすべて野外で自然日照下および紫外線カットフィルム下で行ない、それぞれ別々に抽出、活性試験を行なった。それぞれの図で左側は自然日照下で栽培したもののテスト結果を、右は紫外線カットフィルム下で栽培したもののテスト結果を示してある。

その結果、ニシヨモギは、自然日照下、紫外線カットのいずれにおいても栽培土壌の抗酸化能への顕著な影響は見られなかった。(図3)

リュウキュウヨモギは、季節により最適栽培土壌が変わることが分かった(図4)。この結果から、自然日照下では夏場には国頭マーヅで栽培されたものが活性が高く、それ以外の季節はジャーガルが活性が高い。紫外線カット下での栽培ではこの季節による影響が非常に大きく、今回の研究期間に行なった実験では、得られた結果を十分に説明するには至らなかった。今後この栽培での抗酸化能を中心とした薬草の特徴を継続調査することで、科学的な新しい知見が得られる可能性もある。

カラヲヨモギは、夏場にジャーガルで最も抗酸化能が高くなり、秋から冬にかけて島尻マーヅでの栽培が最も抗酸化能が高くなる。国頭マーヅの自然日照下での栽培では1年を通して抗酸化能に差がない(図5)。これらのことより、期間を限定してジャーガルか島尻マーヅで栽培することで、抗酸化能の強い薬草製品を作ることができる。一方、1年を通して安定した品質の製品を生産する場合、国頭マーヅを用いると良いと思われる。

オトコヨモギは各土壌間の抗酸化能に大きな差はなく、いずれを用いても栽培は可能であると思

われる (図6)。しかし、紫外線をカットした条件下での栽培では、明らかに島尻マーヅが抗酸化能の強い薬草を生産しているため、ハウス栽培や日当たりの悪い環境での栽培では、島尻マーヅでの栽培が良いと考えられる。

ボタンボウフウ (図7) とベニバナボロギク (図8) は抗酸化能に関して同じような傾向を示している。すなわちいずれの季節でも自然日照下ではジャーガルでの栽培が最も抗酸化能が高く、国頭マーヅ、島尻マーヅがそれに続いている。このことからこれら2つの薬草はジャーガルでの栽培が適していると思われる。

概して、自然日照下での栽培では、島尻マーヅで強い活性を示す傾向に有るものはニシヨモギで、ジャーガルではその他のリュウキュウヨモギ、カワラヨモギ、オトコヨモギ、ボタンボウフウ、ベニバナボロギクであった。

一方、紫外線カットフィルム下では、島尻マーヅによる栽培でニシヨモギ、リュウキュウヨモギ、オトコヨモギ、ベニバナボロギクのエキスが活性が強く、カワラヨモギとボタンボウフウはジャーガルでの栽培で活性が良い傾向があった。

以上の結果から、それぞれの薬草で抗酸化能を最大限に発揮させる土壤には差があり、今後特定の薬草を栽培する場合、その薬草に適した土壤を選ぶことが非常に重要であることが分かった。

栽培土壤と抗酸化能には一定の規則が見られることを予想していたが、その傾向は全くなく、薬草の種類による差が見られただけであった。このことは、抗酸化以外の効能を持つ薬草を栽培する場合にも適用できるものと思われるため、各薬草栽培において最適土壤の検討が必要であると考えられる。

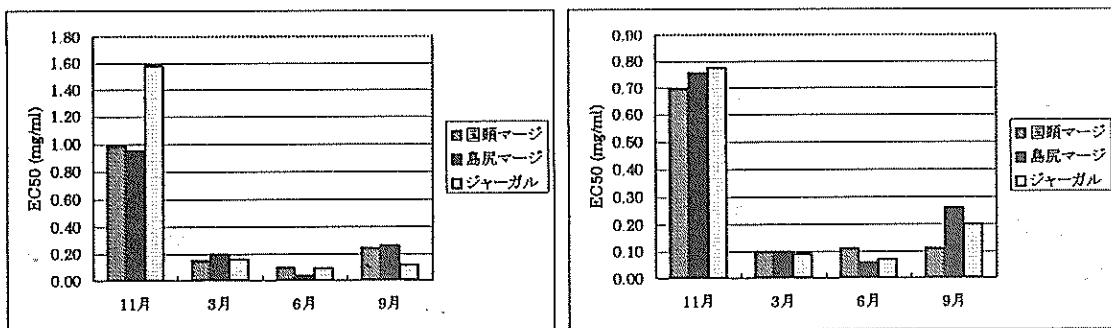


図3 ニシヨモギ (左: 自然日照、右: 紫外線カット) 抽出エキス of 栽培土壤によるラジカル消去活性の差

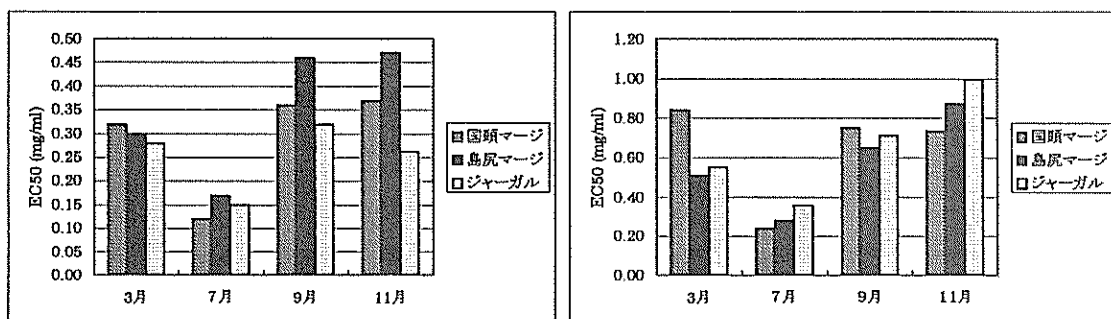


図4 リュウキュウヨモギ (左: 自然日照、右: 紫外線カット) 抽出エキス of 栽培土壤によるラジカル消去活性の差

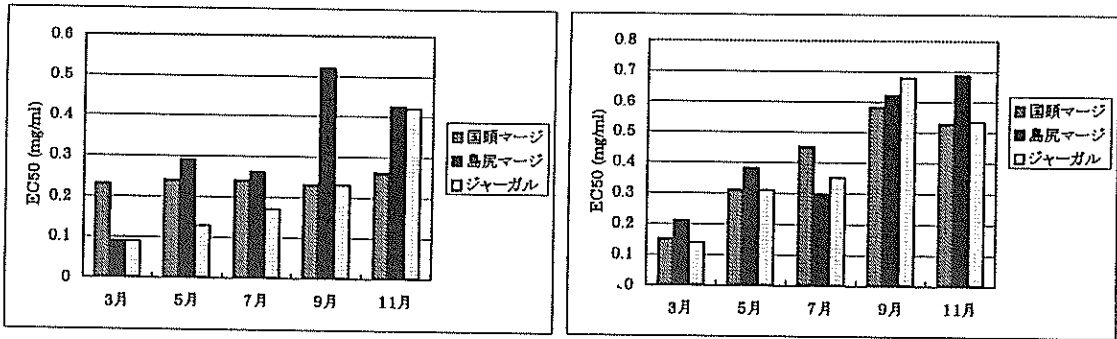


図 5 カワラヨモギ (左：自然日照、右：紫外線カット) 抽出エキスの栽培土壤によるラジカル消去活性の差

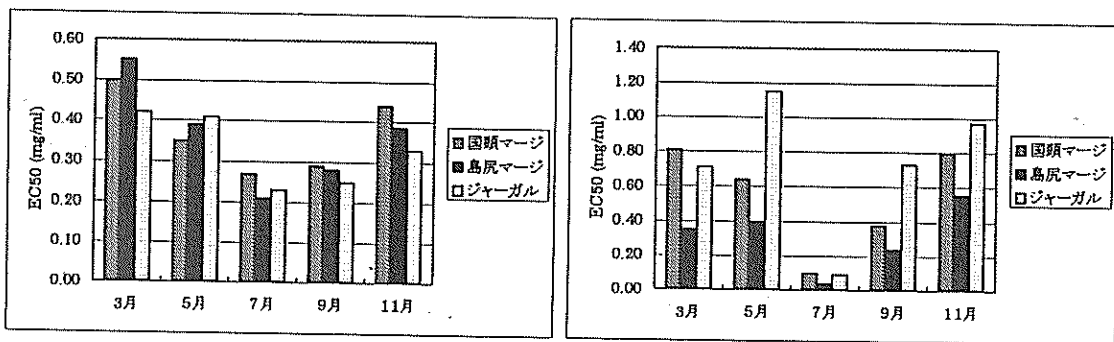


図 6 オトコヨモギ (左：自然日照、右：紫外線カット) 抽出エキスの栽培土壤によるラジカル消去活性の差

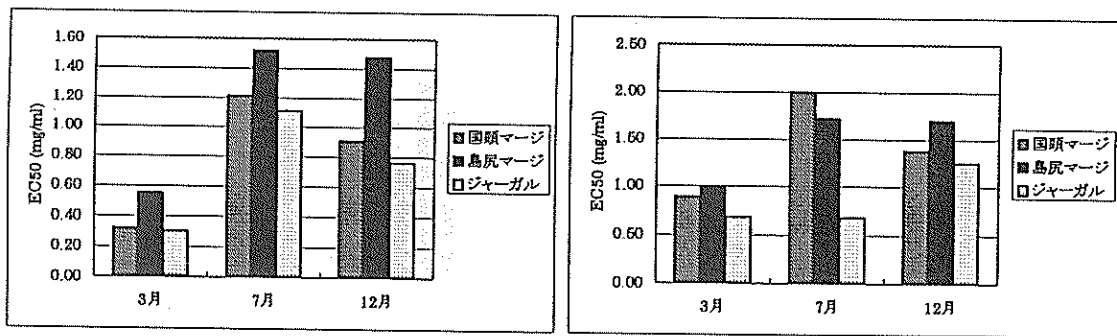


図 7 ボタンボウフウ (左：自然日照、右：紫外線カット) 抽出エキスの栽培土壤によるラジカル消去活性の差

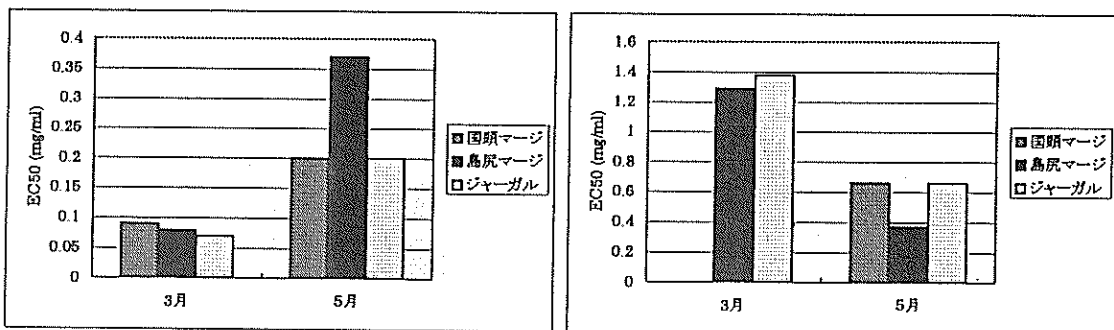


図 8 ベニバナボロギク (左：自然日照、右：紫外線カット) 抽出エキスの栽培土壤によるラジカル消去活性の差

2. 紫外線照射の有無による抗酸化能の違い

リュウキュウヨモギ (図9)、ボタンボウフウ (図11)、ベニバナボロギク (図11) は、紫外線の照射を無くすと抗酸化活性成分の生産が抑制されることが分かった。特に、ベニバナボロギクでは (図11) 紫外線照射の有無で抗酸化活性が一桁以上違うことから、紫外線量と抗酸化活性成分生産とは明らかに関連があるものと考えられる。一方、ニシヨモギ (図9) とカワラヨモギ (図10) では、紫外線照射の抗酸化活性への影響はあまり見られない。

オトコヨモギは、紫外線を遮ったほうで抗酸化活性が上昇しており (図10)、またその他の葉草に關しても栽培土壤により紫外線量と抗酸化活性が逆転する結果が得られている。このことは、これまで考えられていた「紫外線からの防御」が抗酸化活性成分を生産する理由であるという仮定に矛

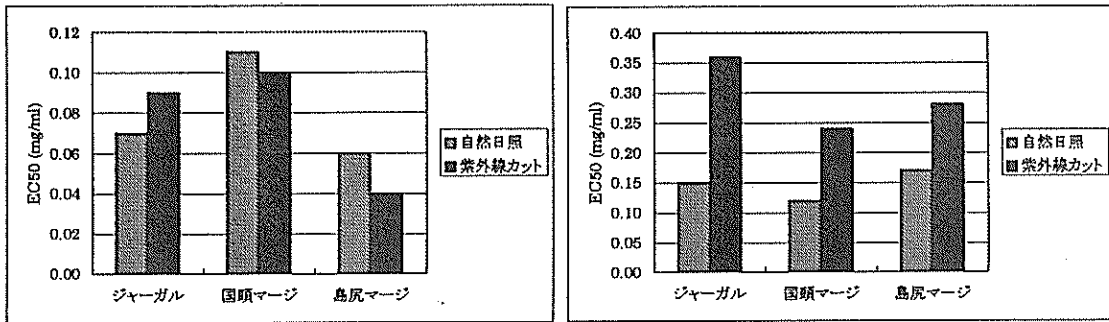


図 9 ニシヨモギ (左: 6月採取) とリュウキュウヨモギ (右: 7月採取) 抽出エキスの紫外線照射の有無によるラジカル消去活性の差

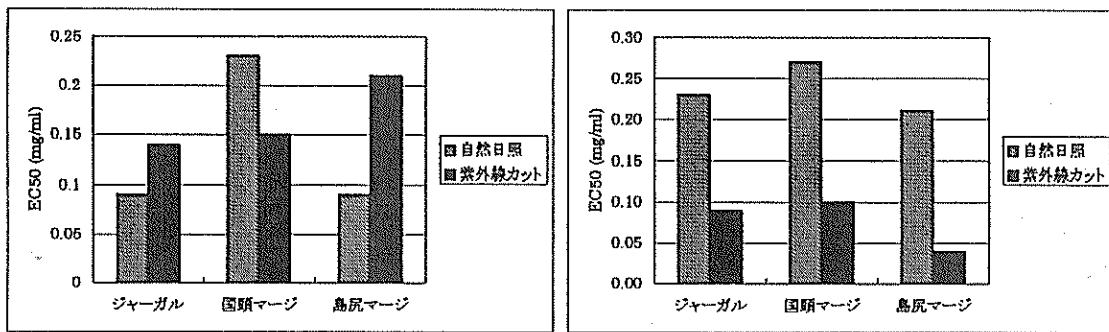


図 10 カワラヨモギ (左: 3月採取) とオトコヨモギ (右: 7月採取) 抽出エキスの紫外線照射の有無によるラジカル消去活性の差

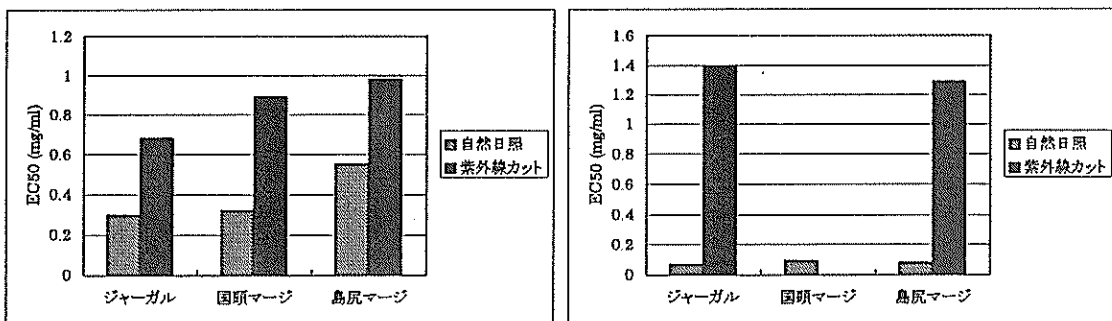


図 11 ボタンボウフウ (左: 3月採取) とベニバナボロギク (右: 3月採取) 抽出エキスの紫外線照射の有無によるラジカル消去活性の差

盾しており、それ以外に抗酸化物質を生産する理由が存在するかもしれないことを示唆している。今後再試験などによりこの結果を確認する必要があるとともに、抗酸化を示すこれら化合物の生体内での役割を証明していく必要があると思われる。

以上ことから、薬草は紫外線による酸化的ストレスを防御するために抗酸化物質をより多く生産していることが示唆されたが、いくつかの例外も存在し、今後再テストを含めた研究が必要であると思われる。

今回試験を行なった薬草では、ベニバナボロギクがもっとも強く紫外線カットの影響を受けていた。このような顕著な影響を受けるものが存在することは、今後薬草の栽培で栽培地の日当たりなども十分に配慮しなければ品質に大きな差が出ることを示している。

3. 薬草の収穫時期による抗酸化能の違い

ラジカル消去活性試験の結果、それぞれの薬草ではっきりと抗酸化能の高くなる季節が観察された。特にボタンボウフウ、ベニバナボロギク、ニシヨモギでその傾向は顕著であった。

ニシヨモギは6月に採集すると抗酸化能が最大となるが3月から6月まではあまり大きな差はなく（図12）夏場であればかなり長い期間収穫が可能であると思われる。しかしながら、11月にはほとんど抗酸化活性物質は生産されていない。一方、リュウキュウヨモギは7月に活性が上がるがその他の季節は比較的低い状態で一定している（図13）。このことからリュウキュウヨモギは1年を通して収穫が可能だが、夏場の極短い期間活性が上がるので品質をそろえるためには注意が必要であると思われる。

カワラヨモギは、国頭マージで栽培すると1年を通して安定した品質のものが得られると思われるが、他の土壌では抗酸化能の強い薬草を得るには、冬場を避け、春先から夏場にかけて収穫するのが有利である（図14）。特に、ジャーガルでの栽培に際しては、季節差が大きいことから、製品の品質を管理する上で注意が必要であると考えられる。

オトコヨモギは夏に抗酸化能が上がる傾向はあるが（図15）、その差は顕著ではない。そのため1年を通して比較的安定的に収穫、供給が可能な薬草であると思われる。

ボタンボウフウ（図16）とベニバナボロギクは（図17）自然日照下で春先の3月から初夏の時期に最も強い抗酸化能を示す。このことからこれらの薬草は春に集中的に収穫しておくことが必要であると思われる。

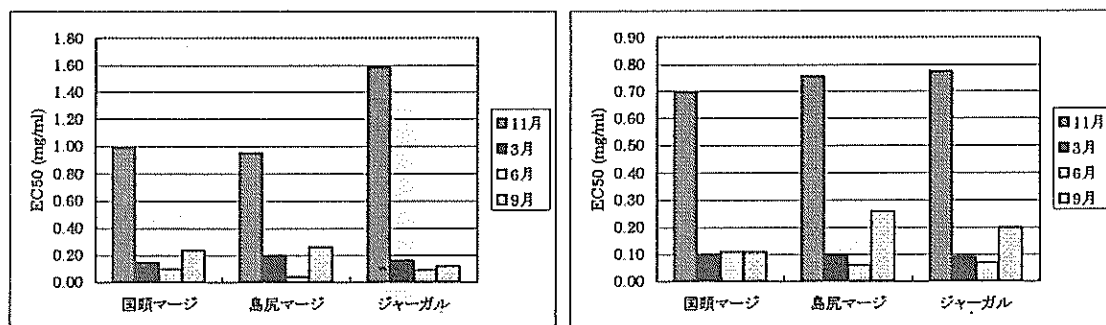


図 12 ニシヨモギ（左：自然日照、右：紫外線カット）抽出エキスの収穫時期によるラジカル消去活性の差

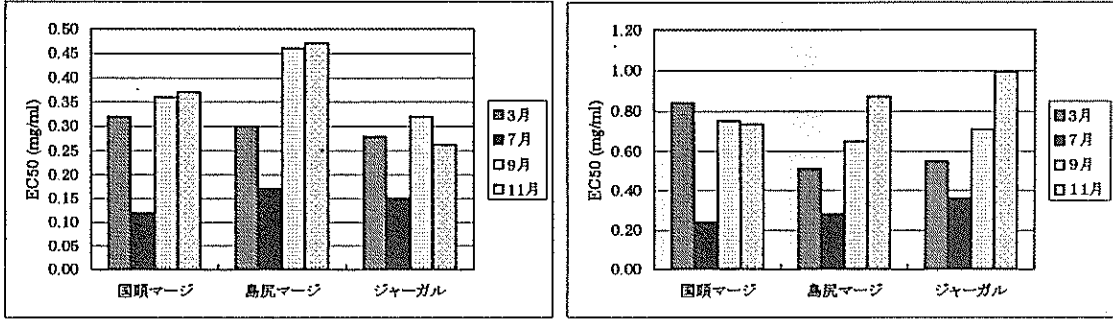


図 13 リュウキュウヨモギ (左：自然日照、右：紫外線カット) 抽出エキスの収穫時期によるラジカル消去活性の差

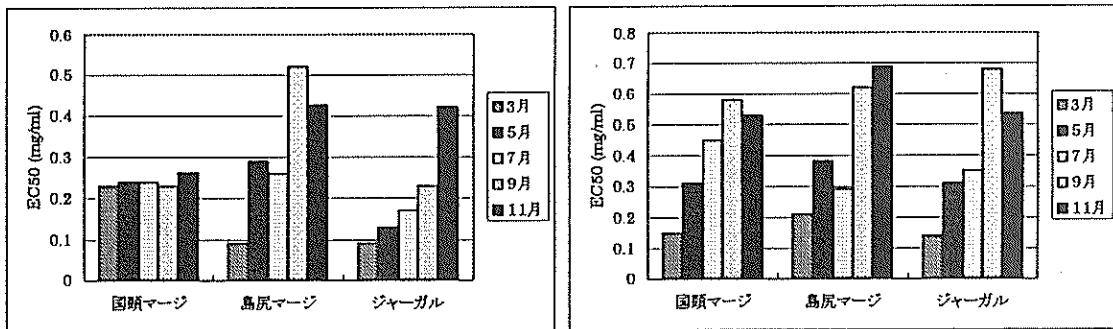


図 14 カワラヨモギ (左：自然日照、右：紫外線カット) 抽出エキスの収穫時期によるラジカル消去活性の差

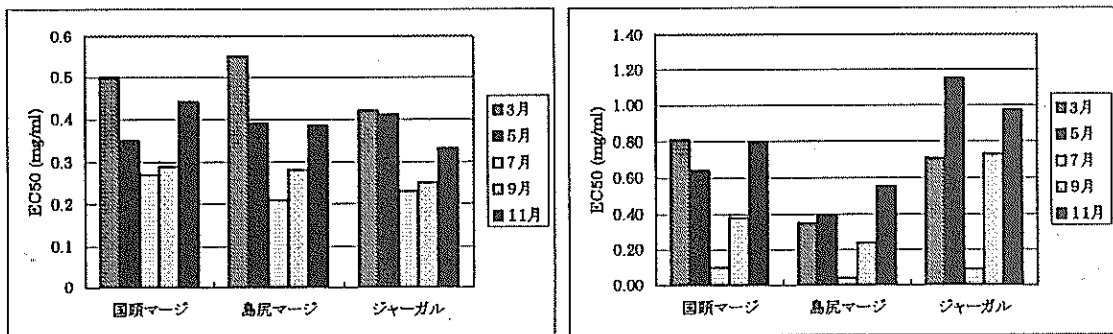


図 15 オトコヨモギ (左：自然日照、右：紫外線カット) 抽出エキスの収穫時期によるラジカル消去活性の差

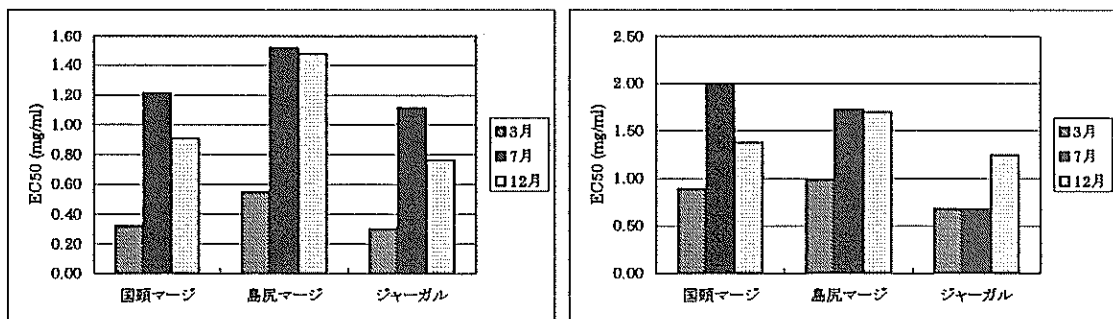


図 16 ボタンボウフウ (左：自然日照、右：紫外線カット) 抽出エキスの収穫時期によるラジカル消去活性の差

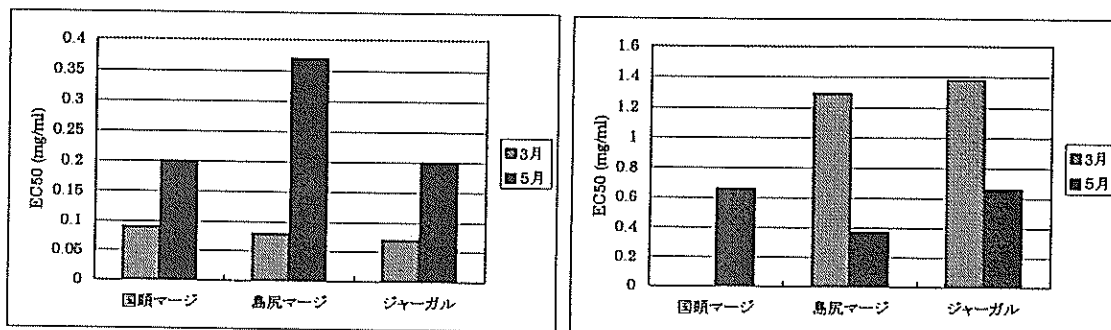


図 17 ベニバナポロギク（左：自然日照、右：紫外線カット）抽出エキスの収穫時期によるラジカル消去活性の差

栽培土壌や紫外線照射の有無同様、季節も各薬草の抗酸化能に大きな影響を与えることが分かった。この季節による活性の差は、他の条件に比べはっきりとした結果が出やすかった。この結果から、夏場に収穫すべき薬草、冬場に収穫すべき薬草そして1年を通して収穫できる薬草があることが分かった。この傾向は、リュウキュウヨモギなどで水抽出物とエタノール/水 1:1抽出物で異なる。このことより、薬草は夏場と冬場では異なる抗酸化物質を生産していると考えられる。

D. まとめ

以上の結果より薬草は、栽培条件により栽培性（収量）に大きな差が生じるだけでなく、抗酸化能にも影響を与えるということが分かった。特に紫外線の強さは抗酸化能に非常に大きな影響があり、このことは沖縄で薬草を栽培することにより、他府県より抗酸化能の強い抽出エキスを得ることができることを示している。

薬草製品の製造では、あつかう原料により各工場の稼働率が変動し、効率が上がらないという問題があった。この薬草の抗酸化成分生産の特徴（栽培条件による収量と、抗酸化能）を効率よく組み合わせることで、1年を通して特定の薬草を安定供給でき、工場の稼働率を上げることも可能であると思われる。

現在沖縄県内での薬草の栽培状況では、ウコンとアロエが大部分を占めている。しかしグアバやリュウキュウヨモギも一部の農家で栽培が行なわれており、需要に応じて規模を拡大することは可能な状況にある。

今回の研究結果から、最適な栽培条件等に関する基礎的な情報は十分に収集できたものと思われる。今回の研究期間は1年間と限られており、完全な栽培要領を作成するには至らなかったが、今後継続的にグアバ等の栽培を続け、収量と抗酸化能の両面からさらに検討を行う予定である。

第2部 薬草の成分分析法の開発に関する研究

A. はじめに

本研究における成分分析法の開発では、特定の薬草や特定の成分を分析（定性及び定量）する場合とは大きく異なり、多種多様な薬草の広範な成分を分析できる方法を確立する必要がある。天然

の抗酸化化合物は、ビタミンC関連化合物とビタミンA関連化合物を除いてほとんど全てがフェノール性化合物である。^{2) 3)}従って、抗酸化成分探索に当たっての分析法として、できるだけ多くのフェノール性化合物を一度に分析できる方法が望ましいと考えられる。

グアバエキスは、抗酸化フラボノイドの代表であるケルセチンの配糖体を多く含むことが知られており、⁴⁾今回沖縄産薬草の抗酸化性に関する予備実験で、約100種の薬草中抗酸化能が最も強かった。そこでグアバの抗酸化成分を指標に最適抽出法及び分析法を検討した。

B. 方法

1. 装置

サンプルの濃縮はサーバント社のスピードバックまたはビューキ社のロータリーエバポレーター (R-124) による減圧濃縮、及びザイマーク社のターボバップによる窒素ガス吹き付けによる方法で行った。アッセイプレートはバイオマー社の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社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、ダイオネクス社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。超臨界流体抽出ではサーモセパレーションプロダクツ社の超臨界二酸化炭素抽出装置X-10型を用いた。

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社 (送液部: 2690、検出器: 996、データ処理: Millennium32) およびポリマーラボ社の光散乱検出器PL-ELX 1000を用い、カラムとしてウォーターズ社の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社の合成樹脂HP20、または東ソー社のゲルろ過剤TOYOPEARL HW40Fを使用し、精製にウォーターズ社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、カラム: Symmetry C18、19mm×150mm、10 μ m) を用いた。

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

2. 試薬及び試料

(株)仲善から供給される乾燥薬草は、粉碎機にて2分程度粉碎を行った後、250 μ mの篩で粗粒子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。一方、農業試験場から供給される粉末試料は、そのまま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。

抽出溶媒にはエタノールと純水を使用した。エタノールは関東化学一級試薬を、純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 (メタノール、アセトニトリル) は関東化学の特級溶媒を用いた。1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH)、ジメチルスルホキシド、酢酸、トリフルオロ酢酸、ピリジン、無水酢酸、ルチンは和光純薬の特級試薬を用いた。

3. 溶媒抽出

抽出する試料5gをセライト5gと良く混ぜ合わせ、ASE 200用の33mL抽出セルに充填し、抽出圧力2000psi、パージボリューム50%、パージ時間120秒で抽出を行った。

4. 超臨界二酸化炭素抽出 (SFECO₂)

抽出する試料約100gを超臨界二酸化炭素抽出装置の500mL抽出セルに充填し、溶媒は二酸化炭素、エントレーナーはエタノール又は水、コールドトラップに氷又はドライアイスを用い、抽出操作を行った。

5. DPPHラジカル消去作用による抗酸化能の測定

a. 試料の調製

薬草抽出液はポリプロピレン製の遠沈管に移し密栓し5℃で活性測定まで保存した。保存抽出液は2mLづつ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、ジメチルスルホキシド/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。

単離した化合物は、1mg/mLになるよう50%DMSOで調製し活性測定用の試料とした。

b. 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。”

6. 各薬草の抗酸化成分の単離

a. ボタンボウフウ

農業試験場から入手したボタンボウフウの葉50g (10g×5本) を、ASE 200を用いエタノール/水で10分づつ2回抽出した。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25%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、それぞれの画分をHPLCにより精製し、化合物1~4を単離した (図18)。

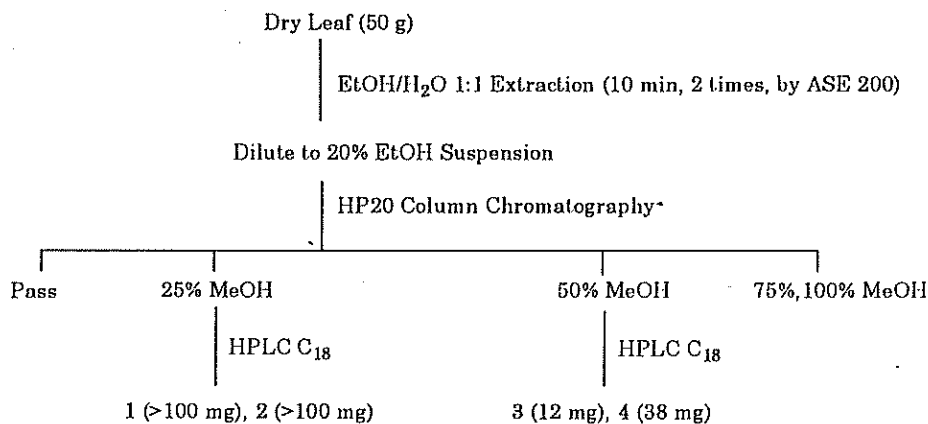


図 18 ボタンボウフウ成分の抽出・分離スキーム

b. ウコンイソマツ

農業試験場から入手したウコンイソマツの全草50g (10g×5本) を、ASE 200でエタノール/水 1:1、25mLを用い抽出し活性抽出液を得た。

活性抽出エキスのうち500mgをHW40Fのカラム (水/メタノール 1:1) で分離し、それぞれの画分の活性試験を行った。その結果UV254nmで検出された主要ピークにもっとも強い活性が見られたため (図19)、この画分をHPLCにより精製し、化合物5を単離した。分離スキームを図20に示す。

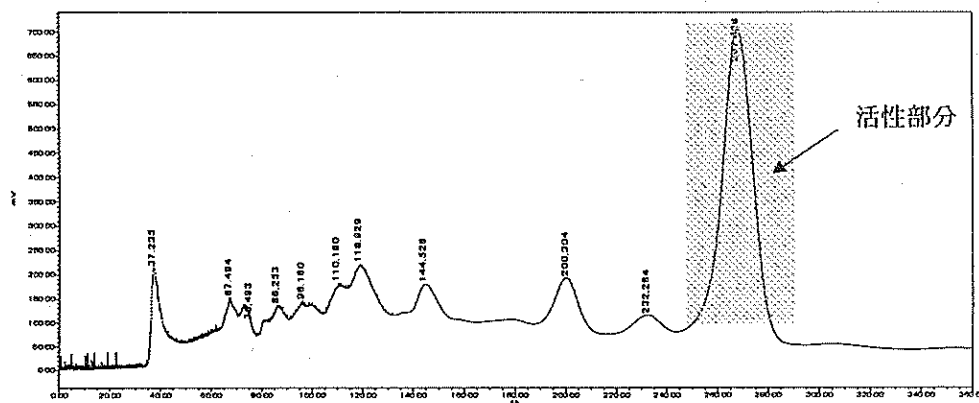


図 19 ウコンイソマツエキスの HW40F によるクロマトグラム

Dry Leaf (50 g)

EtOH/H₂O 1:1 Extraction (10 min, 2 times, by ASE 200)

Concentration

Active Extract (500 mg)

HW40F Column Chromatography with MeOH/H₂O 1:1

Active Fraction

HPLC C18

5 (1.8 mg)

図 20 ウコンイソマツ成分の抽出・分離スキーム

c. 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6~8を化合物10と共に単離した。分離スキームを図21に示す。

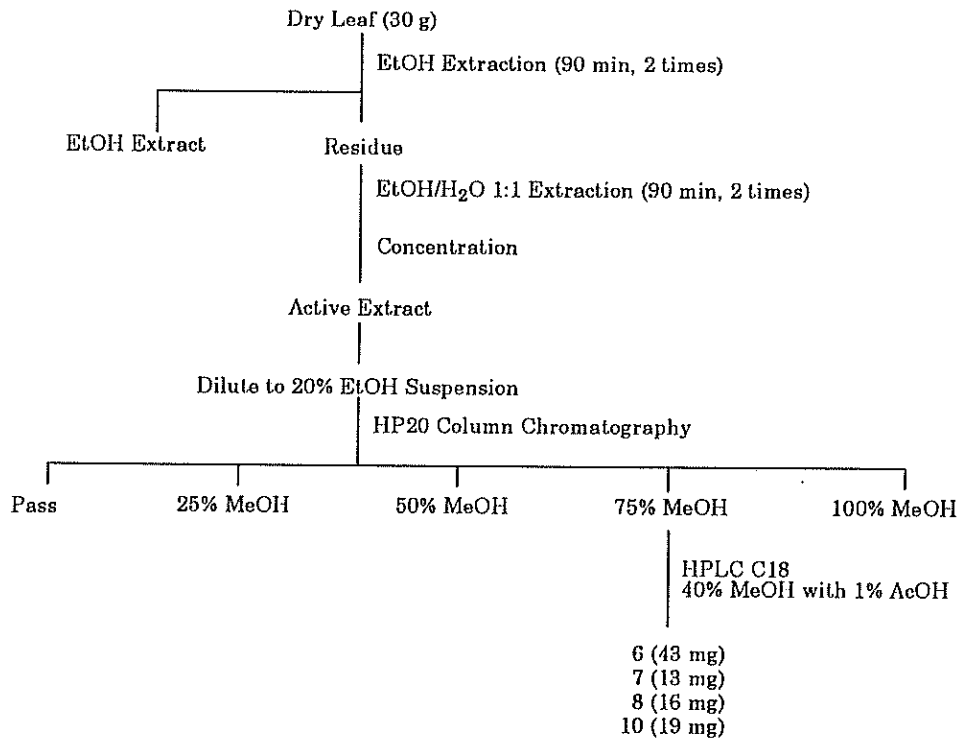


図 21 ニシヨモギ成分の抽出・分離スキーム

C. 結果と考察

1. 超臨界二酸化炭素 (SFECO₂) による抽出

二酸化炭素による抽出は、抽出槽の温度、抽出時間、エントレーナーを表2に示した条件で変化させて行なった。抽出の評価は、抽出物の重量と、そのDPPHラジカル消去活性、および高速液体クロマトグラフィーによるクエルセチン配糖体のピークの有無で行なった。その結果どのような条件を用いた場合でも、DPPHを用いた抗酸化能試験で活性を示さず、また活性成分であるクエルセチン配糖体のピーク（図22の上段のクロマトで、11.5～12.5分付近の5本のピーク）が超臨界二酸化炭素抽出物のHPLCクロマトグラムに存在しないことから、超臨界二酸化炭素では抽出されない事がわかった。

表 2 超臨界二酸化炭素による抽出実験の条件および結果

圧力(Mpa)		温度(°C)		時間(min)		CO ₂ 量 (l)	抽出物重量 (mg)	エントレーナー A:EtOH B:EtOH/H ₂ O 4:1	抗酸化活性
抽出槽	分離槽	抽出槽	分離槽	抽出	分離	総量(分離時)			
30	5	50	室温	61	120	381 (96)	91	A: 5%	なし
30	5	75	室温	65	123	348 (90)	123	A: 5%	なし
30	5	100	室温	70	120	317 (89)	179	A: 5%	なし
30	5	100	室温	60	120	317 (85)	161	A: 1%	なし
30	5	100	室温	65	125	287 (64)	185	A: 5%	なし
30	5	100	室温	60	120	285 (59)	176	A: 10%	なし
30	5	100	室温	345	60	302 (64)	137	B: 5%	なし
30	5	100	室温	75	95	303 (71)	81	B: 2.5%	なし
30	5	75	室温	60	95	(56)	31	B: 5%	なし
		100		60	60	341 (67)	135		

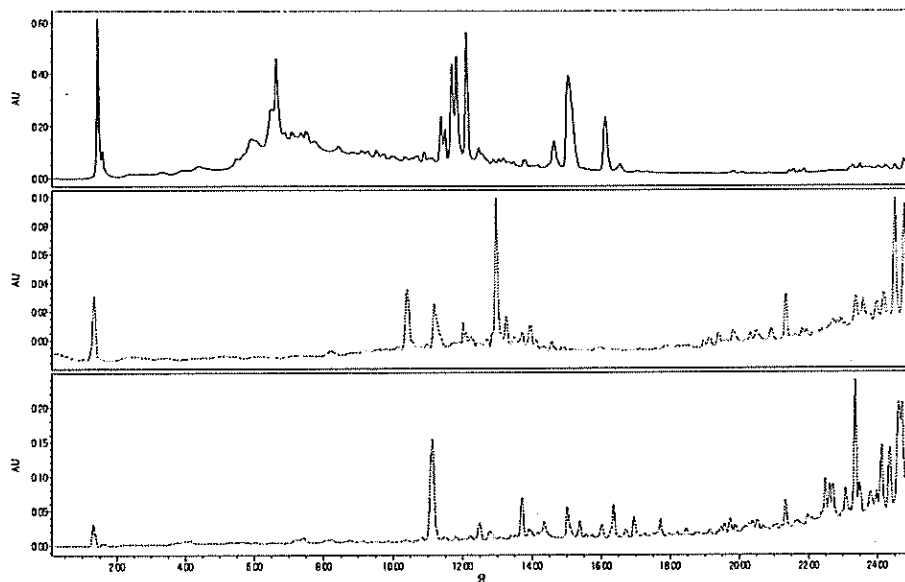


図 22 グァバ抽出物の HPLC による比較
(エタノール抽出物：上、SFECO₂：中、SFECO₂-EtOH：下)

2. 活性成分の構造決定

a. ボタンボウフウ

HP20による粗分離の後分取液体クロマトグラフィーで精製することにより活性化合物1から4が得られた。化合物1と2は、NMRスペクトルの解析よりカフェ酸の糖エステル化合物であることが予想された。そこで¹³C-NMRスペクトルを詳細に検討した結果、化合物1は、糖領域に約60の炭素シグナルが観測されることから約10個の糖がつながり、カフェ酸とエステルを形成している化合物であると推定した。この化合物のさらなる構造情報を得るためAPCI-MS、FAB-MSを試みたが、これまでのところ分子イオンと思われるピークは観測されず構造の決定には至っていない。また化合物2も1と同様に¹³C-NMRの糖炭素の数から約20個の糖が存在すると考えられた。化合物2の構造決定も現在進行中である。一方、化合物3と4は、NMRスペクトル (¹H、¹³C、DEPT、COSY、HMQC、HMBC) の解析と、それらデータの文献値^{5) 6) 7)}との比較により、ケルセチンの配糖体であることが分かった。さらにMSのデータと、上記NMRスペクトルデータの詳細な解析により、化合物3と4は、図23に示す、ケルセチンにグルコースが置換したフラボノ

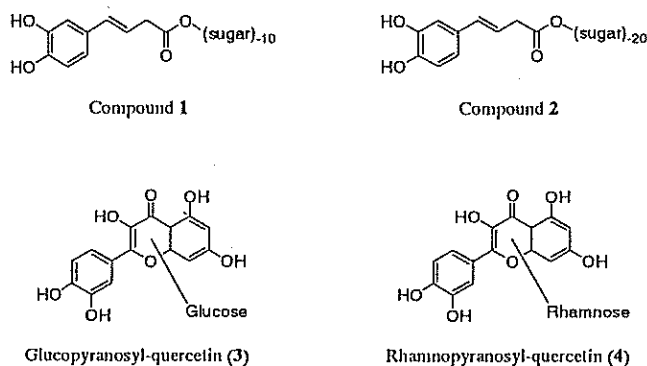


図 23 ボタンボウフウの主要な抗酸化活性成分

イド配糖体であると推定した。グアバから得られた quercetin-3-pyranoglucoside (10) と NMR スペクトルが一致しないことより、その置換位置は C3 以外の炭素であると思われる。置換様式に関しては現在検討中である。

b. ウコンイソマツ

活性化合物5は、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5は、LC-MS (APCI) より分子量170を持つ化合物であることがわかった。LC-UVライブラリーによる検索で、この化合物は没食子酸である可能性が高いと思われたため、¹H および ¹³C-NMR スペクトルを標品のスペクトルと直接比較し没食子酸 (図24) であると同定した。

c. ニシヨモギ

活性化合物として分取液クロで精製し4個の化合物を得た。単離された化合物のうち6と7は、そのUVスペクトル、LC-MS (APCI)、¹H-NMRより同じ発色団を持ち、さらに同じ分子量であることから異性体であることが示唆された。そこで化合物6の2次元NMRスペクトルを検討し、この化合物をカフェ酸のキナ酸エステルの一つであると推定し、そのスペクトルデータを文献値と比較したところ完全に一致したため化合物6の構造を図25と決定した。⁸⁾

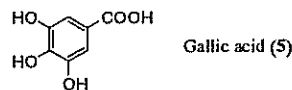


図 24 ウコンイソマツの主要な抗酸化活性成分

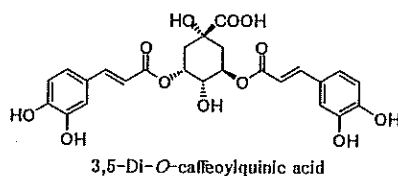


図 25 化合物 6 の構造

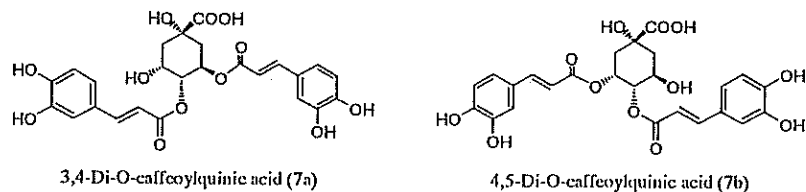


図 26 化合物 7 に可能な 2 つの構造

一方、化合物7は、6同様カフェ酸のキナ酸エステルであることが示唆されたが、その構造は図26に示すように2通り考えられた。NOE等分光学的な方法で構造を決定できないか検討するために、これら分子の3次元的な構造を調べてみることにした。方法は Chem3Dソフトウェアを用い、MM2によるエネルギーの最小化計算を行ない、それぞ

これの構造に最も安定な立体配座を求めることを行なった。その結果を図27に示した。それによるとNMRによる構造の推定も可能であると思われたが、むしろアセチル化により決定するほうが容易で確実であると考えられたので、化合物7をピリジンと無水酢酸によりアセチル化を行なった。図27に示すように、もし7aの構造であれば、C1の水酸基とC5の水酸基は隣接しており、普通はアセチル化されないC1の水酸基もエステル転移によりアセチル化されるはずである。一方もし7bの構造であれば、これら2つの水酸基はエステ

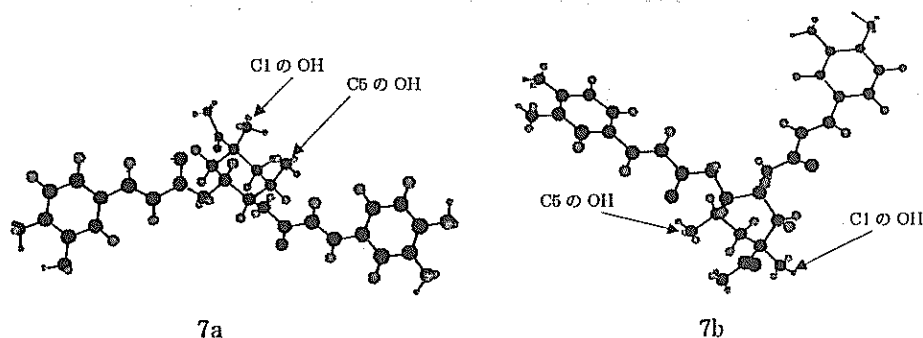


図27 MM2 エネルギー最小化による最安定配座

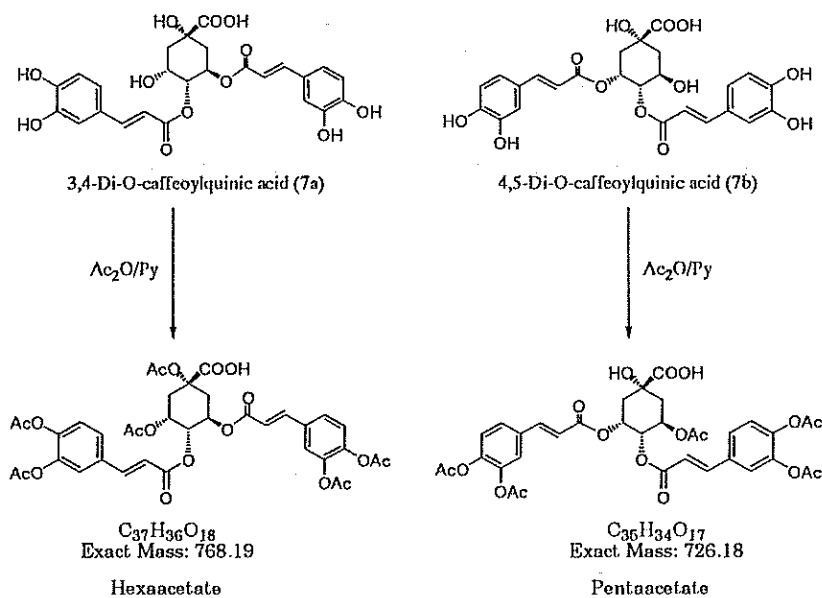


図28 化合物7のアセチル化反応

ル転移を起こすことはないため、3級水酸基であるC1の水酸基はアセチル化されることなく残るはずである (図28)。

このアセチル化の結果得られたものは、ネガティブモードのFAB-MSでm/z767に (M-1) のイオンを示すことと (図29)、¹³C-NMRで6本のアセチル基のピークが観測されること (図30) から、化合物7の6アセチル化体であることが分かった。この結果と、立体配座から予想された情報を考察して化合物7の構造を図31と決定した。

化合物8は、これまで得られた化合物とは全く異なるタイプのものであることが¹³C-NMRより示唆された。そのもっとも大きな特徴はsp²炭素が6個で、またsp炭素が1個

一方、化合物10は、6と7とは全く違う種類の化合物であることがLC-MS (APCI) 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スペクトルをグアバから単離されたクエルセチン^{5) 6) 7)}の一連の配糖体と比較したところ、グルコース配糖体の化合物10と一致したことより化合物10であることが分かった。

3. DPPHによる抗酸化成分の抗酸化能

これまでに単離した他の成分 (図33) も加えて、全成分に関してDPPHによる活性試験を行なった (表3)。この結果、今回単離した化合物の抗酸化能は、その多くが既存の抗酸化剤であるビタミンE (37μM) やカテキン (59μM) に匹敵するものであることが分かった。

表 3 単離された化合物の DPPH ラジカル消去活性

化合物名 (化合物番号)	起源薬草名	EC ₅₀ (μM)
Caffeic acid polysuccharide (1)	ボタンボウフウ	200
Caffeic acid polysuccharide (2)	ボタンボウフウ	400
Quercetin-glucoside (3)	ボタンボウフウ	46
Quercetin-rhamnoside (4)	ボタンボウフウ	33
Gallic acid (5)	ウコンイソマツ	14
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid (6)	ニシヨモギ	48
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid (7)	ニシヨモギ	52
Prunasin (8)	ニシヨモギ	>2000
Quercetin-3-pyranogalactoside (9)	グアバ	52
Quercetin-3-pyranoglucoside (10)	グアバ	49
Quercetin-3-pyranoxyloside (11)	グアバ	54
Quercetin-3-pyranoarabinoside (12)	グアバ	60
Quercetin-3-furanoarabinoside (13)	グアバ	49
Quercetin-3-pyranorhamnoside (14)	グアバ	79
Herniarin (15)	リュウキュウヨモギ	>2000
Eriodictyol (16)	リュウキュウヨモギ	59
Rhamnetin (17)	リュウキュウヨモギ	127
Eupatolitin (18)	リュウキュウヨモギ	61
Capillaricin (19)	リュウキュウヨモギ	>2000
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenoxy)-chromenone (20)	リュウキュウヨモギ	>2000
5,6,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenoxy)-chromenone (21)	リュウキュウヨモギ	40
Rutin (22)	オオイタビ	105
Apigenin-6-(2"- <i>O</i> -rhamnosy)-glucoside (23)	オオイタビ	1454

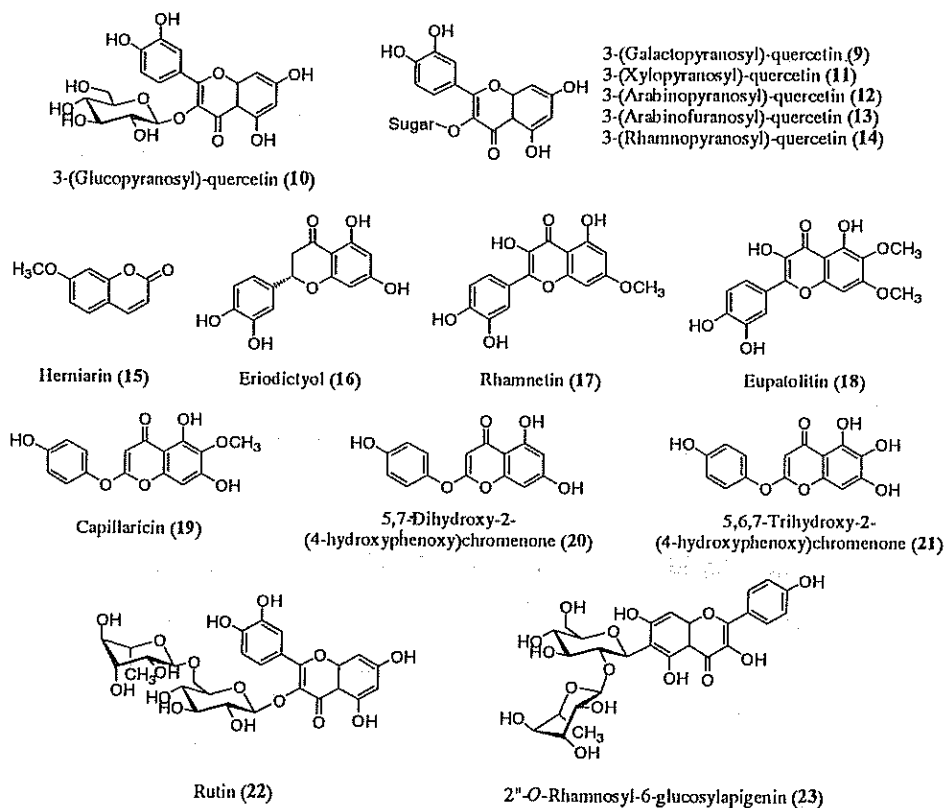


図 33 本プロジェクトでこれまでに単離された化合物

さらにこれら活性化合物のDPPHラジカル消去活性が、その構造と強い相関があることも分かった。すなわち化合物10や21のように構造中に1,2ジオール（図34）を持つ化合物はいずれも50 μ M前後の活性を示し、一方、同じフェノール性水酸基を持つものの1,2ジオールタイプでないと化合物19や20のように（図35）非常に弱いかまたは全く活性を示さない。さらにフェノール性水酸基を全く持たない化合物15や8も（図36）全く活性を示さないということが分かった。

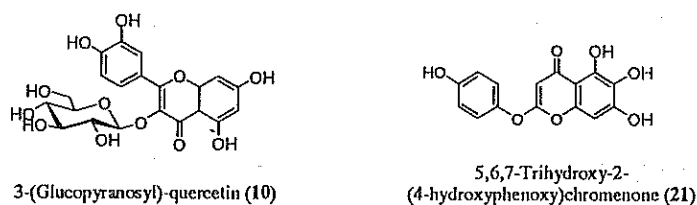


図 34 構造中に 1,2 ジオールを有する化合物の例

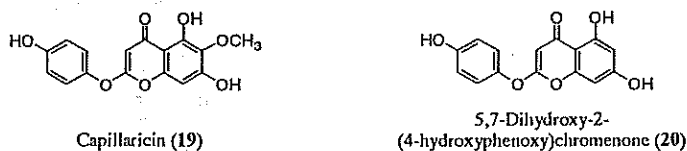


図 35 構造中に 1,2 ジオールを有しない化合物の例

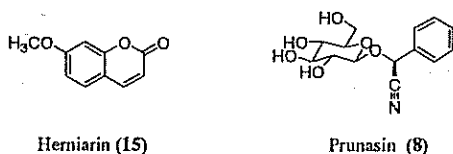


図 36 構造中にフェノール性水酸基を有しない化合物の例

D. まとめ

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、抗酸化能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。

グア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いことが分かった¹⁾。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¹⁾。グアバをはじめとして、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。

今回の研究でもっとも興味を持ち、また期待して試みた超臨界二酸化炭素抽出による薬草からの効率的な抗酸化成分抽出では、得られたほとんどの抗酸化成分が配糖体であることもあり抽出には成功しなかった。しかしながら、二酸化炭素による抽出技術はまだ十分に確立されておらず、エントレーナーの検討など、今後の技術の進歩により、リュウキュウヨモギから得られた成分のようなアグリコン化合物の抽出は可能になるかもしれない。

今回の成分研究では、これまでエキスに関してしか調べられていなかった、沖縄の薬草の抗酸化能を化合物レベルで解明でき、約1年の期間に6種類の薬草の抗酸化成分の分析を行ない、24種の化合物を単離、構造決定できた。これら24種の化合物は全て既知化合物であったが、ウコンの成分であるクルクミンが、最近の抗酸化に関する薬理的な研究で再度脚光を浴びることになったことから、今回の24化合物も、近年の薬理化学的研究結果をもとに、その薬理活性等を見直してみる価値が充分にあると思われる。

ベンゼン環上の隣接した2つの水酸基(1,2-ジオール)のキレート作用が、ポリフェノール類の抗酸化能に非常に重要であることが知られており、¹⁾今回単離した化合物ではその傾向がはっきりと出ている。今後のこの性質を利用することでさらに効率的な抗酸化力の強い成分の探索が可能になるものと期待される。

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)沖縄発酵化学にお礼申し上げます。

本研究開発は、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たものである。研究期間は2年間で、本報告は、最終年度(平成11年度)の研究成果をまとめたものである。

参考文献

- 1) 市場俊雄、喜屋武裕子、“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）” 沖工技セ研究報告第1号（1998）
- 2) 二木鋭雄、島崎弘幸、美濃真編 “抗酸化物質 - フリーラジカルと生体防御 - ” 学会出版センター（1996） pp107-116
- 3) 井上正康編著 “活性酸素と医食同源” 共立出版株式会社（1996） pp150-291
- 4) Lozoya, Xavier; Meckes, Mariana; Abou-Zaid, Mamdouh; Tortoriella, Jaime; Nozzolillo, Constance; Arnason, John Thor. *Arch. Med. Res.* 1994, 25, 11-15
- 5) Kalinowski, Hans-Otto; Berger, Stefan; Braun, Siegmар著 “Carbon-13 NMR Spectroscopy” John Wiley & Sons (1988)
- 6) Breitmaier, Eberhard; Voelter, Wolfgang “Carbon-13 NMR Spectroscopy, High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry (Third, completely revised edition)” VCH Verlagsgesellschaft mbH (1987)
- 7) Agrawal, P. K. Edited “Carbon-13 NMR of Flavonoids (studies in organic chemistry 39)” Elsevier (1989)
- 8) Timmermann, B. N.; Hoffmann, J. J. *J. Nat. Prod.* 1983, 46, 365-368
- 9) Caudona, L.; Fernández, I.; Pedro, J. R.; Vidal, R. *Phytochemistry*, 1992, 31, 3507-3509

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。