

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00798

研究課題名(和文) 調理プロセスで発生する加熱生成成分の機能性、安全性に関する基礎的知見の確立

研究課題名(英文) Studies on pharmaceutical activities produced by heat treatment of foods

研究代表者

新藤 一敏 (Shindo, Kazutoshi)

日本女子大学・家政学部・教授

研究者番号：80350180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食材の加熱加工(調理における様々な加熱条件)により生じる新たな薬理活性物質について、主に香辛料を中心に探索した。加熱前の食材抽出物と加熱後の食材抽出物をDAD HPLC分析で比較し、加熱後に検出されるピーク成分を各種クロマトグラフィーにより単離精製し、NMR、MS解析によってその化学構造を明らかとした。その後、精製された純品化合物を用いて、それらの抗酸化活性及び糖尿病改善作用を検討した。ローズマリー加熱物中に、新規化合物2つを含む5つの化合物が生じていることを見出した。それらの抗酸化活性、糖尿病改善作用を検討した結果、新規な2化合物が特に優れた薬理活性を持つことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食材そのものに含有される薬理活性物質に関する研究・報告はこれまでに多くあるが、加熱調理による薬理活性物質に関する研究・報告はこれまでほとんど見当たらない。そこで本研究では、多くの化学物質を含む香辛料を中心に、元の食材には含まれず加熱して生じる化学物質を探索した。その結果、ローズマリー加熱物中に、元化合物には検出されない5化合物(新規2化合物含む)を見出した。調理物中に含まれ、我々も日常的に摂取しているこれらの物質の薬理活性を新たに見出すことは大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We screened new bioactive compounds produced by heat treatment of foods (mainly spices) by comparing its non heated extract with heated extract using DAD HPLC system (Column: ODS, Solvent: CH₃CN gradient, Detect: 200 - 500 nm). We isolated the peak compounds observed only in heated extracts using some chromatographies, and determined their structures by NMR and MS analyses. Finally, we examined their antioxidant and antidiabete activities. In heated rosemary, we found 5 new compounds which do not exist in raw one. We isolated them and determined their structures using NMR and MS analyses, and proved that two of them were new compounds and the other three compounds were natural compounds reported in other plants. We examined their antioxidant and antidiabete activities and found the new two compounds possess more potent antioxidant and antidiabete activities than carnosol and carnosic acid contained in raw rosemary.

研究分野：食品化学

キーワード：加熱調理 単離精製 構造解析 ローズマリー 抗酸化活性 抗糖尿病活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々が摂取する食品材料自体にどのような天然成分が(どのくらいの量)含まれているかについては、既にほとんどのもので網羅的な分析研究が実施済みであり、またそれら天然成分の薬理活性についても多くの報告がなされている。一方多くの場合、我々は食品材料を加熱調理を通して食しているが、このような調理プロセスで人工的に発生する化学成分(加熱生成成分)に関する研究は、香りや色(メイラード反応産物等)成分に関する研究以外は未だほとんど見当たらない。そのような成分の中には、未だ発見されていない我々にとって好ましい薬理活性成分が存在する可能性がある。そこで多くの化学成分を含み、加熱調理対象となるスパイス類を中心に、加熱により生じる成分について、その化学構造の解析と薬理活性の調査を行うことに大きな関心を持った。

2. 研究の目的

本研究においては、加熱生成成分について多くの食品材料に対して網羅的探索を行い、それらの化学構造を明らかにすると同時に、それらの薬理活性(抗酸化活性、抗糖尿病活性)の検討を実施して、食材の新たな機能性に関わる基礎的な知見を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) スクリーニング

香辛料を中心とする加熱調理対象となる食品材料 20 種について加熱(フライパン上中火で 5 分)・非加熱エキス(CH₂Cl₂:MeOH(1:1)抽出エキス、50% MeOH 抽出エキス)を調整し、DAD HPLC システム(詳細条件は表 1)で両者を比較した。加熱エキスでのみ観測されるピークを記録した。

表 1 DAD HPLC 条件

*Column: CAPSELL PACK MG-II (4.6 mm x 100 mm)

*Flow rate 1.0 mL/min

Solvent A: 5% CH₃CN + 20 mM phosphate

Solvent B: 95% CH₃CN + 20 mM phosphate

0 3 min A 100%

3 18 min A 100% B 100% (linear gradient)

18 30 min B 100%

*Detect: 200 - 500 nm

(2) 単離精製

スクリーニングで見出された加熱生成成分ピークについては、各種クロマトグラフィーを用いた生成を行い、純品の化合物とする。

(3) 構造解析

純品となった化合物については、各種 NMR (1D: ¹H, ¹³C, 2D: ¹H-¹H DQF COSY, HMQC, HMBC, NOESY), HR-ESIMS により構造解析を実施し、その化学構造を確定する。

(4) 生理活性試験

構造が確定した化合物については、以下のアッセイ系を用いて抗酸化活性、抗糖尿病活性を検討した。各アッセイの原理を示す。

【抗酸化試験】

A: ラット脳脂質過酸化抑制作用

生体に対する活性酸素による障害は、複数の活性酸素種による複合的な作用によるものと判断される。そこでこの複合的な活性酸素障害に対する抑制作用(生体に対する活性酸素障害の

抑制作用)として、ラット脳脂質を生体脂質として用い、これのラジカル種による酸化を抑制する作用の有無を検討する。

【抗糖尿病活性】

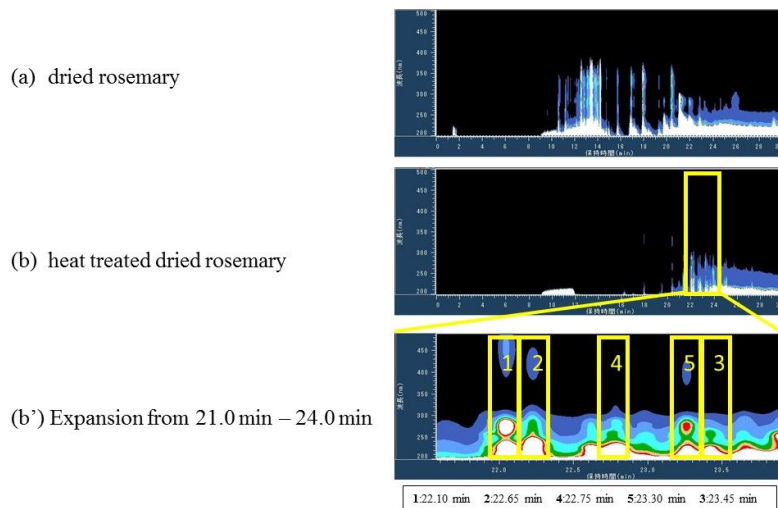
マウス 3T3-L1 細胞は、インシュリン等の刺激下で PPAR agonist 様活性を有する化合物と接触すると、脂肪細胞へ分化する。分化した脂肪細胞はグルコースを取り込む作用を有し、血液中の血糖値を下げる抗糖尿病作用を示す。3T3-L1 細胞が脂肪細胞へと分化すると細胞内に脂肪滴が観察され、脂肪滴の量はこれをオイルレッドで染色することにより定量することができる。そこで、マウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化程度をオイルレッド染色により判定する。

4. 研究成果

(1) スクリーニング

20 種の食材スクリーニングの結果、ローズマリー加熱抽出物にのみ観測されるピークとして図 1 に示す 1 - 5 が見出された。

図1 DAD HPLC analyses data of CH₂Cl₂-MeOH (1:1) extract.



(2) 単離精製

スクリーニングで見出された加熱生成成分ピーク 1 - 5 について、ローズマリー加熱物からこれらの単離精製実験を実施した。具体的には 35 g の乾燥ローズマリーをフライパン中に入れ、中火で 5 分間加熱した。加熱物をビーカーに回収後、CH₂Cl₂-MeOH (1:1) 溶液 100 mL で 2 回抽出 (室温で攪拌 30 分) した。溶液をろ過後濃縮乾固したところ 4.22 g であった。次にこのエキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 *n*-hexane : EtOAc (10:1)) に供し、10 mL ずつ溶出液を分画した。加熱生成成分ピーク 1 - 5 は fr. 11 -37 に溶出されたため、これらを合して濃縮乾固した (450 mg)。本画分を最終的には分取 ODS HPLC (カラム: DEVELOPSIL C30, 250 mm × 20 mm i.d.; 溶媒: 90% CH₃CN (v/v); 流速: 8.0 ml/min; 検出: PDA, monitored at 200-500 nm) で各ピークごとに分取し、それぞれの純品を得た (化合物 1: 溶出時間 14.9 分 30.0 mg、化合物 2: 溶出時間 16.5 分 2.2 mg、化合物 3: 溶出時間 19.2 分 5.4 mg、化合物 4: 溶出時間 17.3 分 5.3 mg、化合物 5: 溶出時間 18.0 分 3.2 mg)。

(3) 構造解析

単離精製が完了した成分 1 - 5 については、各種 NMR (1D: ¹H, ¹³C, 2D: ¹H-¹H DQF COSY, HMQC, HMBC, NOESY), HR-ESIMS により構造解析を実施した。その結果 1 - 5 の各構造を図 2 に示すように決定した。

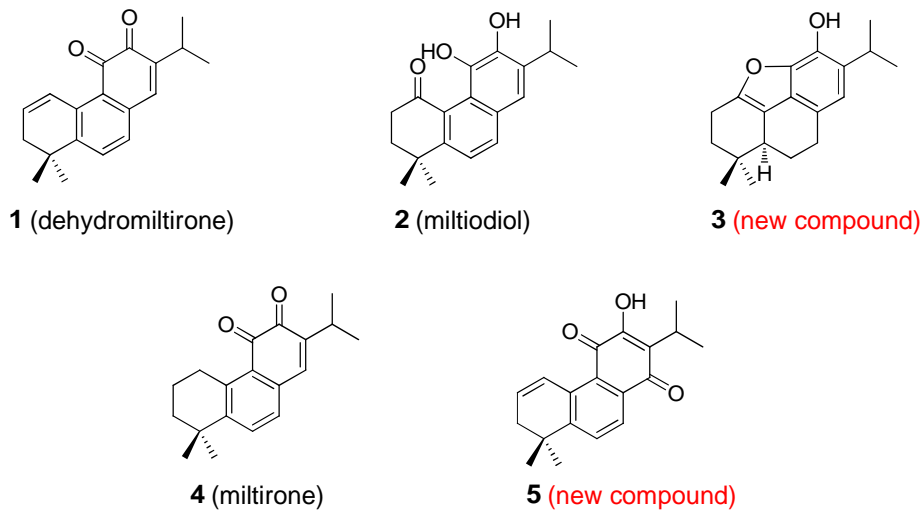


図2 決定された各化合物の構造

化合物 1, 2, 4 は既知の天然化合物（名称はカッコ内に記載）であったが、3 と 5 は新規化合物であった。

(4) 生理活性

【抗酸化活性】

表 2. Lipid peroxidation inhibitory activities of carnosic acid and compounds 1 – 5.

Compound	IC ₅₀ (μM)
carnosic acid (CA)	0.07
1	0.94
2	0.11
3	0.03
4	0.27
5	1.06

化合物 1 – 5 の抗酸化活性を表 2 に示す。

本実験より、化合物 2, 3 が carnosic acid と同程度の強いラジカル消去活性を有することが明らかとなった。

【抗糖尿病活性】

化合物 1 – 5 の抗糖尿病活性を図 3 に示す。本図より化合物 3, 5 が carnosic acid より優れた PPAR_γ agonist 活性を有することが明らかとなった。

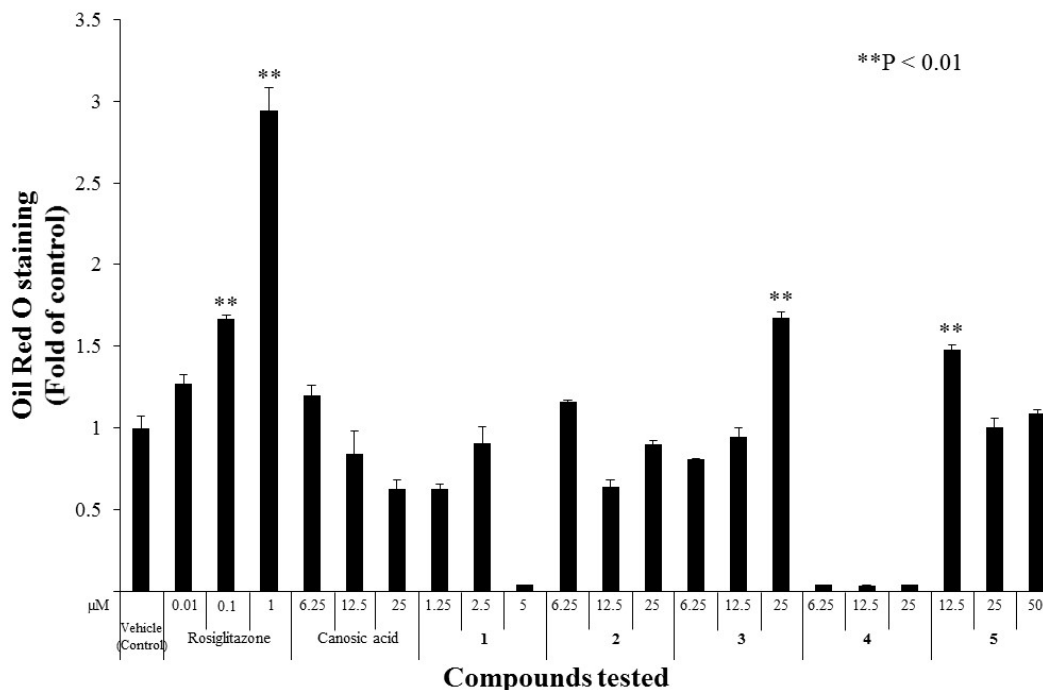


図3 化合物1 - 5の抗糖尿病活性 (3T3-L1 分化誘導活性)

【生理活性まとめ】

表2, 図3ではいずれも positive control として非加熱ローズマリーに含有されており、酸化活性、抗糖尿病活性が報告されている carnosic acid を比較対象として用いている。これらの表、図より明らかなように、加熱によって生じる新規化合物 3, 5 はいずれも carnosic acid より優れた活性を示している。従って当初の目的通り、本研究によりこれまで存在が明らかでなかった加熱により生じる優れた薬理活性を示す新規化合物を見出すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Y. Buchin, Y. Sakemi, R. Hamashima, Y. Morioka, D. Yamanaka, F. Hakuno, S. Takahashi, K. Shindo. Structures and biological activities of new carnosic acid- and carnosol-related compounds generated by heat treatment of rosemary. *Phytochemistry Letters*. 30, 43-48 (2019)

〔学会発表〕(計 1 件)

酒見裕香、Bu-chin Yu、濱島留梨子、森岡優子、山中大介、伯野史彦、高橋伸一郎、新藤一敏、ローズマリーの加熱処理によって生成された新規化合物の構造解析と生理活性について、2019年度日本農芸化学会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。