

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 11日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580152

研究課題名（和文）

長鎖アシル基を持つ無辛味カプサイシン類縁体の唐辛子食品からの探索と生成機構の解明

研究課題名（英文）

Long chain *N*-vanillyl-acylamides from *Capsicum* oleoresin

研究代表者

古旗 賢二 (KOBATA KENJI)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：70275105

研究成果の概要（和文）：トウガラシオレオレジン中に6種の長鎖アシル基を持つ無辛味カプサイシン類縁体（LCNVA）を見出した。これらLCNVAはトウガラシオレオレジンには比較的多量に含まれていたが、トウガラシ果実にはほとんど含まれていなかった。オレオレジン中のLCNVA間の含有比率は、オレオレジンの油画分の脂肪酸組成と酷似していた。以上のことから、LCNVAはトウガラシ果実には元来含まれておらず、オレオレジンへの加工過程あるいはその貯蔵過程で生成することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found six long-chain *N*-vanillyl acylamides (LCNVAs) from *Capsicum* oleoresin. The amount of these LCNVAs in the oleoresins was larger than that in fresh fruits of hot peppers. The composition of these LCNVAs in oleoresins was similar to that of fatty acids in the oil fraction of oleoresins. These LCNVAs might be spontaneously generated from capsaicin (or vanillylamine) and plant oils during the storage and maturation of oleoresin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度			
2013年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：食品、トウガラシ、カプサイシン、無辛味類縁体、バニルアミン、植物油、トリアシルグリセリド

1. 研究開始当初の背景

トウガラシ（唐辛子）の辛味成分としては、カプサイシンを主成分とした類縁体群があり、その基本構造はバニルアミンと脂肪酸が脱水縮合したアミド体である。現在までに15種類を

越える類縁体が天然物として報告されており、それらは脂肪酸部分（アシル基）の鎖長あるいは分枝構造が異なったもので、鎖長としての炭素数は9～11である。

一方、カプサイシン類縁体の化学構造と辛味

の関連については詳細に研究されており、アシル基の鎖長が炭素数9（カプサイシンが該当）のものが最も強い辛味を示し、それよりも短くても長くても辛味は低減する。炭素鎖長が16を越える合成類縁体では辛味はほぼ消失する。

カプサイシンには非常に多岐にわたる生理活性が報告されているが、カプサイシン自身が有する非常に強い辛味（刺激性、侵害性）が、その有効利用を妨げているのが現状である。そこで、カプサイシンと同様の生理活性を持ちながら刺激性の低い類縁体として、アシル基にオレイン酸（C18:1）部分を持つオルバニル（図1）が開発された。オルバニル（olvanil）には、鎮痛作用、抗炎症作用、血管拡張作用、ガン細胞の増殖抑制効果などの作用があり、また、カプサイシン受容体（TRPV1）アゴニストとして、カプサイシンと共に、疼痛や様々な生理作用に関する研究ツールとして利用されている。オルバニルに関しては、毒性はほとんどないとされており、臨床研究への試みも進められている。さらに、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、DHAなどをアシル部分に持つ類縁体が、有用物質として開発・研究されている。

しかしながら、これら長鎖アシル基をもつカプサイシン類縁体（Long chain N-vanillyl acylamide、LCNVA）は、天然物あるいは食品成分中からは見出されておらず、現在のところ、機能性食品成分としての利用は全く考慮されていない。

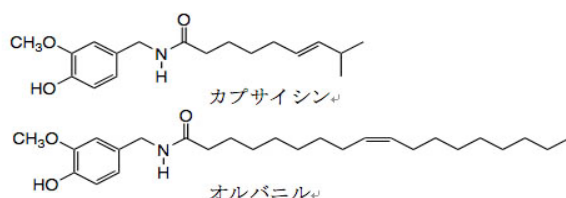


図1

2. 研究の目的

LCNVAの中には無辛味でありながら、カプサイシン様の多岐にわたる有用な生理活性を有するものがある。しかしながら、これまでLCNVAは天然物あるいは食品成分としては報告されていない。

トウガラシオレオレジン（トウガラシから調製される植物油であり、カプサイシンに加え、オレイン酸、リノール酸などの長鎖脂肪酸を豊富に含む。つまり、LCNVAが生成するための基質は食品素材中にそろっており、化学的な変化、あるいは酵素的な変化（発酵）などによりLCNVAが蓄積されている可能性がある。

本研究は、LCNVAが食品中に存在することを明らかにし、また、その生成メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料

3種類のトウガラシオレオレジン（サンプルA～C）は中国の市場で入手した。新鮮なトウガラシ果実（タカノツメ、ハバネロ）は、静岡県立大学の試験農場で栽培した物を用いた。

(2) トウガラシオレオレジンからのLCNVAの単離・構造決定

トウガラシオレオレジン（サンプルA）87.8gをメタノールで抽出した。抽出物8.7gをシリカゲルカラム（70mmφ×200mm）を用いてヘキサン-酢酸エチル混合溶媒系で分画した。LCNVAを含むと思われる画分をさらに中圧液体逆相クロマトグラフィー（ODSカラム26mmφ×300mm、水-メタノール混合溶媒系）、高圧液体逆相クロマトグラフィー（ODSカラム20mmφ×150mm、水-メタノール混合溶媒系）を行うことにより、化合物1～6の化合物を得た。

各化合物の構造は、APCI-MS解析（API2000、Applied Biosystems）NMR解析（JEOL α-400、JEOL）により決定した。また構造中の脂肪酸の同定は、化合物をメタノール分解した後GC-MS（Agilent 6890GC & 5975MSD）で行った。

(3) トウガラシオレオレジンおよびトウガラシ果実中のLC-MS/MSによるLCNVAの定量

トウガラシオレオレジン（サンプルA～C）および新鮮なトウガラシ果実の凍結乾燥物のメタノール抽出物中に含まれるLCNVA含有量をLC-MS/MS（Nanospace SI-1, Shiseido, API2000）を用いて測定した。

LC-MS/MS条件として、LCにはODSカラム（Unison UKC-8, 2mmφ×150mm, Intakt Co.）と0.1%酢酸含有の水-メタノール混合系の容離液で流速0.2mL/minを用い、MS/MSではイオン源APCIでポジティブイオン検出を行い、各LCNVAのプロトン付加した分子イオンピーク[M+H]⁺とLCNVAに共通するフラグメントイオンピークm/z137を選択して検出するMRMモードを用いた。各LCNVA標準物質で作成した検量線により、サンプル中のLCNVAを定量した。

(4) トウガラシオレオレジンとトウガラシ果実の油画分のGC-MSによる脂肪酸組成の測定

トウガラシオレオレジン（サンプルA～C）および新鮮なトウガラシ果実の凍結乾燥物のメタノール抽出物に、内部標準物質としてペンタデカン酸を加えた。ケン化後、フッ化ホウ素、メタノールを用いて脂肪酸メチルとしてGC-MSで定量した。

4. 研究成果

(1) トウガラシオレオレジンからのLCNVAの単離・構造決定

トウガラシオレオレジン（サンプルA、87.8g）は、植物油であるトリアシルグリセリドが主成分であるため、脂溶性の高いLCNVAを含むカプサイシン類と植物油を分離するために、メタノールによる液-液抽出を行った。この抽出物（8.7g）を順相及び逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより6種の化合物（Comp. 1～6）を得た。

各化合物の¹H-NMRスペクトルは、カプサイシン類に特徴的な3置換ベンゼン、メトキシ基、ベンジル位のメチレンを示した。また、高磁場側には長鎖脂肪酸に由来するシグナルが観測された。これらの脂肪酸の構造について、各化合物のメタノール分解により得られる脂肪酸メチルエステルをGC-MS解析することにより決定した。さらに、APCI-MSによる分子量測定、¹³C-NMRスペクトルのデータから各化合物の構造を推定した。推定構造に相当する標準物質のデータと照らし合わせるにより、Comp. 1～6をそれぞれmyrvanil、palvanil、stevanil、olvanil、livanil、linvanilと同定した（図2）。

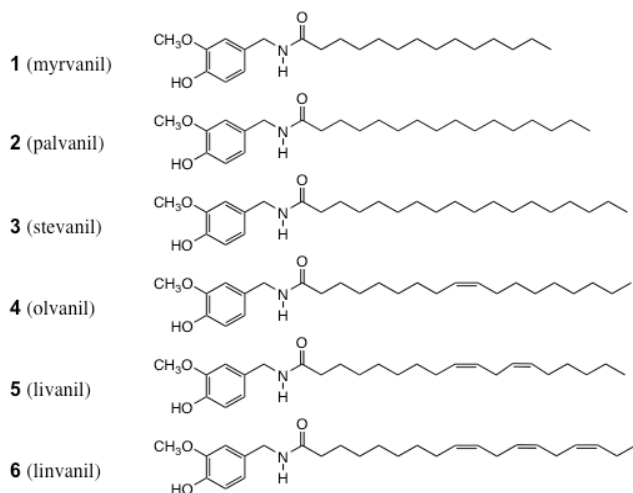


図2 トウガラシオレオレジンより得られたLCNVA

(2) トウガラシオレオレジンおよびトウガラシ果実中のLC-MS/MSによるLCNVAの定量

LCNVAのAPCI-MSの特徴は、プロトン化された分子イオンピークと、そのコリジョンにより生じるm/z137のバニル基のフラグメントピークである（図3）。この2種のイオンを選択的に検

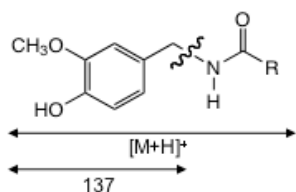


図3 LCNVAの質量分析における開裂様式

出する（MRM）ことにより、高感度でLCNVAを定量することができた。LCNVA標準物質のMRMクロマトグラムを図4に示す。

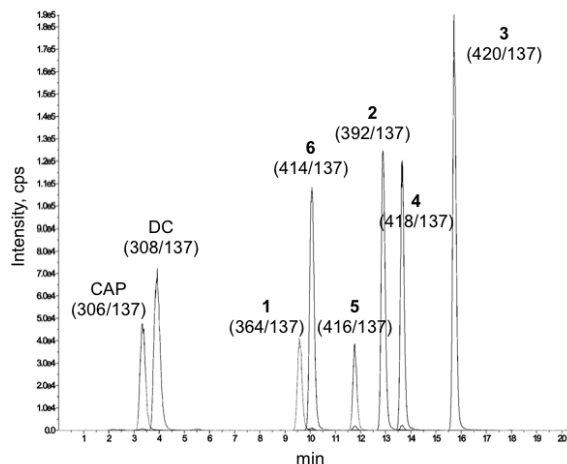


図4 LCNVA標準物質のMRMクロマトグラム
CAP:カプサイシン、DC:ジヒドロカプサイシン

表1に各サンプル中のカプサイシン類とLCNVAの含有量を示した。トウガラシオレオレジン、トウガラシ果実とも、カプサイシン(CAP)とジヒドロカプサイシン(DC)が非常に多く、LCNVAに関しては、オレオレジンのサンプルAには比較的多く含まれていたものの、その他のサンプルでは非常に少ないものであった。CAP含有量を100とした場合のLCNVA類の存在比率では、トウガラシオレオレジンではLCNVA類の存在比がトウガラシ果実に比べて高く、サンプルAではLCNVAの存在比の合計は41%であった。トウガラシ果実では、Comp. 1を除くと、いずれも0.01%以下と非常に低い存在率であった。以上のことから、LCNVAはトウガラシ果実中にはほとんど含まれないが、トウガラシオレオレジン中には比較的多く含まれることが明らかとなった。

表1 トウガラシオレオレジン、トウガラシ果実中のCAP、DC、LCNVAの含有量(μg/g)

	オレオレジン			トウガラシ果実	
	A	B	C	ハバネロ	タカノツメ
CAP	5790 (100)	3.33 (100)	6490 (100)	90500 (100)	9020 (100)
DC	4170 (72)	2.96 (89)	4750 (73)	33400 (37)	6670 (74)
1	19.5 (0.34)	0.0060 (0.18)	4.21 (0.07)	36.1 (0.04)	4.41 (0.05)
2	392 (6.80)	0.0025 (0.08)	1.05 (0.02)	2.80 (<0.01)	0.578 (<0.01)
3	45.9 (0.79)	0.0016 (0.05)	0.13 (<0.01)	0.0155 (<0.01)	0.0025 (<0.01)
4	544 (9.40)	0.0007 (0.02)	1.02 (0.02)	0.0346 (<0.01)	0.0030 (<0.01)
5	1370 (24.0)	0.0037 (0.10)	3.15 (0.05)	ND	0.0017 (<0.01)
6	17.4 (0.30)	0.0013 (0.04)	0.649 (0.01)	0.0530 (<0.01)	0.0009 (<0.01)

()はCAP含有量を100とした場合のLCNVA類の存在比率
CAP:カプサイシン、DC:ジヒドロカプサイシン

(3) トウガラシオレオレジン中のLCNVA含有量と
油画分の脂肪酸組成との関連

図5はトウガラシオレオレジン、トウガラシ果実中のLCNVAと油画分の脂肪酸(FA)の含有組成(%)を示したものである。各サンプルのLCNVAの含有組成では、オレオレジンサンプルのA~Cでは、Comp. 1、2だけでなく、特にComp. 5の存在比も高値を示した。一方、果実ではComp. 3~6は、ほぼ存在しなかった。Comp. 5は、リノール酸をアシル側鎖に持つLCNVAであり、リノール酸は、トウガラシ植物油の主要な構成脂肪酸であることから、LCNVA類と各サンプルの植物油(油画分)の構成脂肪酸との関連を調べた。

いずれのサンプルも植物油の主要な構成脂肪酸はリノール酸で、続いてパルミチン酸とオレイン酸が多く含まれていた。LCNVAの含有組成と比較すると、トウガラシオレオレジンの3つのサンプルで、Comp. 1を除いてLCNVA類と植物油の脂肪酸組成はよく似たパターンを示した。特にサンプルAは酷似していた。

以上のことから、Comp. 1、2は、トウガラシ果実に初めから含まれていた成分であり、Comp. 3~6は、果実をオレオレジンに加工する段階、あるいは加工後の保存段階で、生成したものと考えられた。これらのLCNVAの生成には、サンプルの大部分を占める植物油が関与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Kenji Kobata, Kazumi Saito, Hitomi Tate, Aki Nashimoto, Hiromi Okuda, Ikue Takemura, Ken Miyakawa, Masayoshi Takahashi, Kazuo Iwai, and Tatsuo Watanabe. Long-chain N-vanillyl-acylamides from Capsicum oleoresin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (査読あり), 58 (6), 3627-3631, 2010.

[学会発表] (計3件)

- ① 古旗賢二, 齋藤和美, 楯人美, 梨本亜紀, 奥田祐美, 竹村郁恵, 宮川健, 高橋和良, 岩井和夫, 渡辺達夫. トウガラシオレオレジンに含まれる長鎖N-バニルアシルアミド類(LCNVAs). 日本農芸化学会2010年度大会, 2010年3月28日, 東京.
- ② 久保田佳織, 齋藤和美, 楯人美, 梨本亜希, 奥田裕美, 竹村育恵, 宮川健, 坂田充紀, 高橋和良, 古旗賢二, 岩井和夫, 渡辺達夫. 長鎖N-バニルアシルアミド類はトウガラシオレオレジン中に含まれる. 第25回日本香料研究会, 2010年11月12日, 静岡.

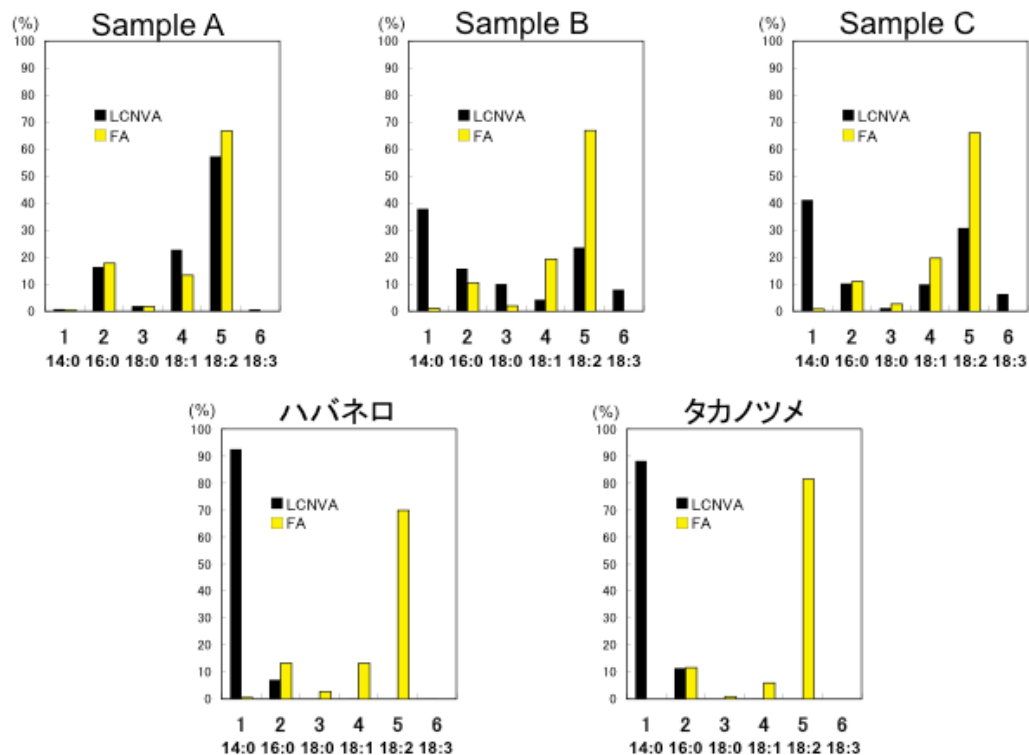


図5 トウガラシオレオレジン、トウガラシ果実中のLCNVAと脂肪酸(FA)の含有組成(%)
14:0, ミリスチン酸; 16:0, パルミチン酸; 18:0, ステアリン酸; 18:1, オレイン酸; 18:2, リノール酸;
18:3, リノレン酸

③Kenji Kobata, Kazumi Saito, Hitomi Tate, Aki Nashimoto, Hiromi Okuda, Ikue Takemura, Ken Miyakawa, Masayoshi Takahashi, Kazuo Iwai, and Tatsuo Watanabe. Long chain N-vanillyl-acylamides from Capsicum oleoresin, International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2011, 2011年11月15日, 札幌.

[図書] (計1件)

古旗賢二, シーエムシー出版, 「スパイス・ハーブの機能と最新応用技術」2011年, p. 178-182.

6. 研究組織

研究代表者

古旗 賢二 (KOBATA KENJI)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 70275105