

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25年 6月14日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580139

研究課題名（和文）フラボノイド抱合体合成法の確立と抱合体の機能性評価

研究課題名（英文）Development of a method for the synthesis of flavonoid conjugates and evaluation of their physiological functionalities.

研究代表者

津志田 藤二郎 (TSUSHIDA TOJIRO)

宮城大学・食産業学部・教授

研究者番号：00353920

研究成果の概要（和文）：

フラバノン、フラボン、フラボノール、イソフラボンと N,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、ピリジン三硫酸を作用させると、高収率でフラボノイド硫酸抱合体が合成できることを明らかにした。一方、フラボノイドのグルクロン酸抱合体は、アセトブロモグルクロン酸メチルエステルを作用させることによって合成できたが、その収率は低かった。抱合体の ACE 阻害作用などの機能性評価を行った結果、抱合体はどれもアグリコンより活性が低いことが分かった。

研究成果の概要（英文）：

To synthesize flavonoid-*O*-sulfates and flavonoid-*O*-glucuronides, flavanone, flavone, flavonol and isoflavone were reacted with a sulfur trioxide pyridine and an acetobromo-glucuronide methylester. The products were analyzed by HPLC and purified by Toyopearl HW40 column chromatography. Chemical structures of the products were identified by LCMS and ¹H-NMR. The yields of flavonoid-sulfates were good but that of glucuronides were poor. The antioxidant activity and ACE inhibiting activity were decreased by sulfation and glucuronidation of flavonoid aglycones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：フラボノイド抱合体、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体、抱合体合成、ポリフェノール、抗酸化性、ACE 阻害

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは腸管から吸収された後に硫酸やグルクロン酸が結合した抱合体として血中を移動することが明らかになっている。そのため、食事の際に摂取されたフラボノイドは、生体組織の細胞に抱合体として供

給されるものと推定され、培養細胞を用いる機能性メカニズム解明研究などにおいては、抱合体の確保・取得が望まれる。しかし、一般的に食品素材に存在するフラボノイドの多くは、グルコースやガラクトース、ラムノース等の配糖体として存在することから、血

中に存在するタイプの抱合体を食品素材から取得することは難しい状況にあり、有機合成的な手法あるいは酵素を利用した生化学的手法による製造法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

本課題では、フラボノイドの主要なサブグループであるフラバノンやフラボン、フラボノール、イソフラボンに着目し、それらの硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体を有機合成法により合成する方法を確立し、フラボノイドの機能性研究の発展に資することを目的とする。ここでは、抗酸化性、酵素活性阻害作用など、比較的容易に実施できる生理的な機能性について検討し、合成によって得た抱合体の特性を推定する。

3. 研究の方法

(1) フラボノイド試料

以下のフラボノイドアグリコンを購入し合成に用いた。

- ・フラバノン：ナリングニン
- ・フラボン：アピゲニン、ルテオリン
- ・フラボノール：ケルセチン、ケンフェロール、イソラムネチン
- ・イソフラボン：ゲニステイン、ダイゼイン

(2) フラボノイド硫酸抱合体の合成

上記フラボノイドをN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、2倍量の三酸化硫黄ピリジン錯体を加え、室温で2時間反応させた。反応物を蒸留水で希釈しHPLCを用いて合成物を確認した。

①硫酸抱合体の分離・精製

20%メタノールで平衡化したトヨパールHW40Cカラムに、蒸留水で希釈した合成物を吸着させ、メタノール濃度を70%まで上昇させる方法で、合成物の分離・精製を行った。

②硫酸抱合体の同定

精製した合成物1mgをメタノールに溶解した後LCMSに供し、MSスペクトル測定した。また、合成物を重水素化メタノールに溶解し、¹H-NMRスペクトルを測定した。

(3) フラボノイドグルクロン酸抱合体の合成

フラボノイドをN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、これにアセトブromo- α -D-グルクロン酸メチルエステルを1.5倍量、触媒としてK₂CO₃あるいはAg₂CO₃を加えて室温で3時間反応させた。反応終了後、反応液を氷中で冷却した酢酸エチルに注ぎ、酢エチ層を採取・蒸発乾固後、無水メタノールに溶解し、1mol/Lナトリウムメトキシドメタノール溶液を加えて4°Cで2時間脱アセチル化した。この溶液をギ酸で中和し、乾固後無水メタノールに溶解し、1N-NaOHを添加し室温で30分間グルクロン酸のメチルエステルを加水分解除去した。加水分解後の溶液を中和しHPLCで合成物を分析・確認した。

①グルクロン酸抱合体の分離・精製

0.1%ギ酸を含有する50%メタノールで平衡化

したトヨパールHW40Cカラムに合成したフラボノイドグルクロン酸抱合体を吸着させ、メタノール濃度を80%まで直線的に上昇させる方法によって、分離・精製を行った。

②フラボノイドグルクロン酸抱合体の同定

上記硫酸抱合体で実施した方法に準じて、LCMSおよびNMRを用いてグルクロン酸抱合体の構造を推定した。

(4) 抱合体の機能性評価

①DPPHラジカル消去能

試料溶液1mlに0.1M-MES緩衝液(pH6.0)を1mlと400 μ M-DPPHメタノール溶液1mlを加えて攪拌し、20分間室温で反応させた後520nm吸収を測定し、トロロックス標準液と比較することによってDPPHラジカル消去能をトロロックス相当量として算出した。

②ACE阻害活性

0.3M-NaCl含有0.1M-HEPES緩衝液(pH8.3)に試料を溶解し試料溶液を作成した。その試料溶液50 μ Lを試験管に採取して0.8mユニットの酵素を含有する100 μ Lの酵素液と33mM-基質溶液50 μ Lを試験管に添加し、37°Cで40分間酵素反応を行った。これに50 μ Lの1N-HCLを添加し反応を止めた後、750 μ Lの80%メタノールを加え、酵素反応によって生じた馬尿酸をHPLCで分析・定量し、酵素活性を算出した。

4. 研究成果

(1) フラボノイド硫酸抱合体の合成

①ナリングニン-硫酸の合成

ナリングニンからの合成物をHPLCで分析したところ、図1に示したとおり、ナリングニンよりリテンションタイムの早い二つのピークが得られたので、これを溶出順にN-1, N-2と命名した。N-1とN-2をトヨパールHW40Cカラムクロマトグラフィーで精製したところ、136mgのナリングニンからそれぞれ123.6mg、33.1mg得られた。LCMSによって得られたN-1, N-2の分子量はそれぞれ432、352であり、N-1はジサルフェート、N-2はモノサルフェートであることが分かった。¹H-NMRによる構造解析を行ったところ、N-1はナリングニン-7,4'-ジサルフェート(図2)、N-2はナリングニン-4'-サルフェートと推定された。

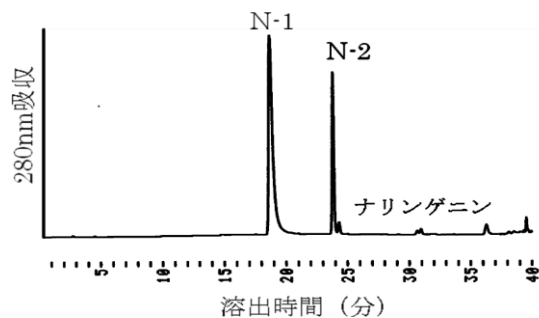


図1. ナリングニン-硫酸のHPLC溶出図

三酸化硫黄ピリジンは、ベンゼン環に結合した水酸基のうち、特にナリンゲニンのB環の4'位の水酸基に結合しやすい特性を持っており、7-モノサルフェートは3'-モノサルフェートより少し早く溶出される特性を持つが、合成量は少量であったため、今回は取得が困難であった。また、5位の水酸基の水素はC環のカルボニル基との相互作用が強いいため、硫酸は結合しないものと推定された。

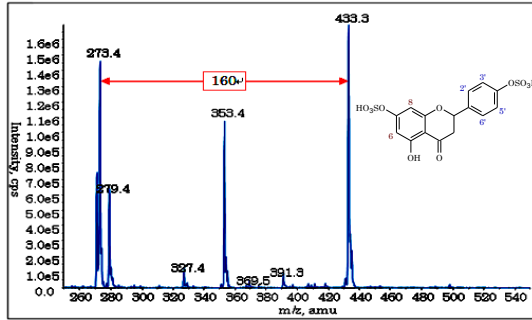


図 2.N-1 の MS スペクトル

②アピゲニン-硫酸

アピゲニンからの合成物を HPLC で分析したところ、図 3 に示したとおり二つのピークが得られるので、それぞれを A-1、A-2 と命名した。二つの合成物をトヨパールカラムで分離・精製し LCMS および ¹H-NMR を用いた解析を行った。その結果、A-1 は ¹H-NMR のシグナルが明瞭に 7 本認められ、アピゲニン 7,4'-ジサルフェートであることが分かった。一方、A-2 は ¹H-NMR のシグナルが 9 本認められ (図 4)、シグナルのシフトの状態から判断し、アピゲニン 4'-サルフェートと 7-サルフェートの混合物であると推定した。

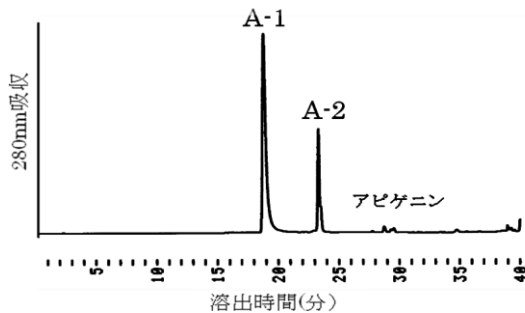


図 3.アピゲニン-硫酸の HPLC 溶出図

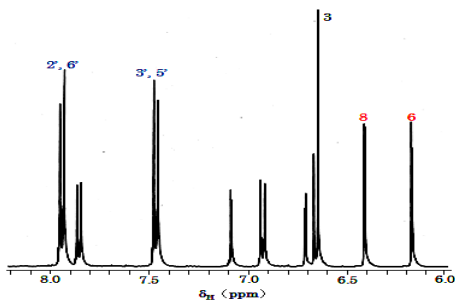


図 4.A-2 の ¹H-NMR スペクトル

③ルテオリン-硫酸

ルテオリンからの合成物を HPLC で分析したところ図 5 に示したとおり 4 つのピークが得られ、それぞれを L-1~L-4 とした。これらを分離・精製し、その化学構造を LCMS および ¹H-NMR を用いて解析したところ、L-1 はルテオリン-7,3',4'-トリサルフェート、L-2 はルテオリン-3',4'-ジサルフェート、L-3 はルテオリン-7,3'-ジサルフェートと 7,4'-ジサルフェートの混合物、L-4 はルテオリン-3'-サルフェートと 4'-サルフェートの混合物であると推定した。

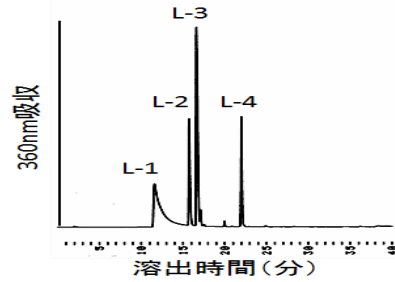


図 5.ルテオリン-硫酸の HPLC 溶出図

④ケンフェロール-硫酸

ケンフェロールからの合成物を HPLC で分析したところ、図 6 に示したとおり 4 つのピークが得られ、それぞれを K-1~K-4 と命名した。これらを分離・精製し化学構造を LCMS 及び ¹H-NMR で解析したところ、K-1 はケンフェロール-3,7,4'-トリサルフェート、K-2 はケンフェロール-3,4'-ジサルフェート、K-3 はケンフェロール-7,4'-ジサルフェート、K-4 はケンフェロール-4'-サルフェートであると推定された。

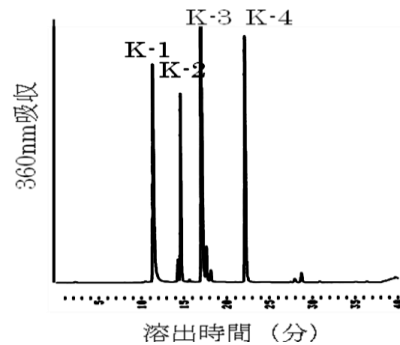


図 6.ケンフェロール-硫酸の HPLC 溶出図

ケンフェロール-7-サルフェートは、少量合成されていると推定されたものの、今回は分離・分取できなかった。

⑤ケルセチン-硫酸

ケルセチンからの合成物を HPLC で分析したところ、図 7 に示したとおり 5 つのピークが検出され、その内ピーク 2 と 3 の分離が不十分であった。これをトヨパールカラムクロ

マトグラフィーで分離・精製したところ4つの画分に別れ、LCMS及び¹HNMRでそれらの化学構造を解析したところ、それぞれの画分の主要成分はケルセチン-3,7,3'-トリサルフェート(図7)、7,4'-ジサルフェート、7,3'-ジサルフェート、3'-サルフェートと4'-サルフェートの混合物であるものと推定された。

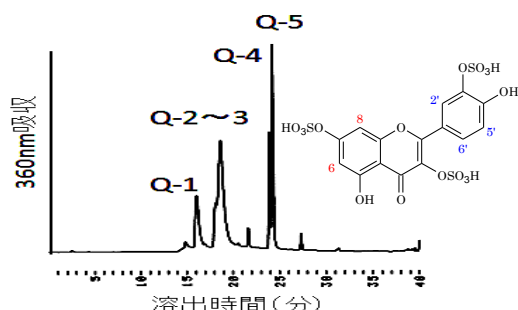


図7.ケルセチン-硫酸のHPLCクロマト

なお、合成したケルセチン-硫酸のうち、モノ硫酸エステルとしては、3'-サルフェート、4'-サルフェート、3-サルフェート、7-サルフェートが生じているものと推定されるが、これらを完全に単一物質として単離するためには、今回用いたトヨパール HW40 と異なる特性を持つ担体で分離・精製する必要があると思われる。特に、モノサルフェート類の生体に対する影響が注目されることから、今後は、このモノサルフェートの生成量に焦点を当てた合成法の検討が必要である。

⑥イソフラボン-硫酸

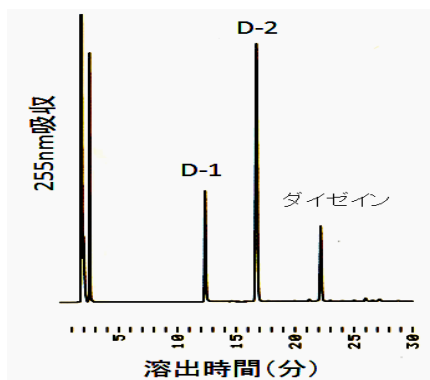


図8.ダイゼイン-硫酸のHPLCクロマト

ダイゼインからの合成物を HPLC で分析したところ図8に示したとおり2つのピークが得られた。また、ゲニステインからの合成物は図9に示したとおり3つのピークであり、溶出位置の近い二つのピークはそれぞれ3'-サルフェートと4'-サルフェートであると推定された。これまでの合成研究の結果、本法はB環の水酸基への硫酸基の結合が生じやすく、B環の3',4'の水酸基に対しては3'位(リテンションタイムが前)が優勢である傾向にあることが分かった。

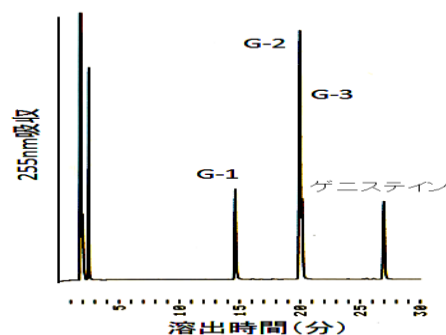


図9.ゲニステイン-硫酸のHPLCクロマト

(2)フラボノイドグルクロン酸抱合体の合成
グルクロン酸の抱合体合成については、ケルセチンとそのメチル化体であるイソラムネチンについて実施した。

①ケルセチン-グルクロン酸

ケルセチンからの合成物を HPLC で分析したところ、未反応のケルセチンを除き3つのピーク QG-1~QG-3 が検出された。LCMS 分析を行ったところ、この3つのピークの分子量は478で、ともにケルセチンモノグルクロニドであることが分かった。市販のケルセチン-3-グルクロニドを添加して HPLC を行ったところ QG-2 がケルセチン-3-グルクロニドであることが分かり、リテンションタイムの比較から QG-1 はケルセチン-7-グルクロニド、QG-3 はケルセチン-4'-グルクロニドであると推定された。但し、これらの合成物の収量は低く、それぞれ4.2%、5.1%、2.8%に相当し、全部合わせて12%程度であった。

②イソラムネチン-グルクロン酸

イソラムネチンからの合成物を HPLC で分析したところ5つのピークが得られた。得られた合成物を分離・精製して、それらの構造を解析したところ、主要な二つのピークは、イソラムネチン 3-グルクロン酸とイソラムネチン-4'-グルクロン酸であると推定された。

(3)機能性評価

①DPPH ラジカル消去活性

ベンゼン環の水酸基は還元性を示す。したがって、硫酸やグルクロン酸がこの水酸基に結合すると還元力が低下し、DPPH ラジカルについては、全ての抱合体においてラジカル消去能の低下が認められた。

②ACE 阻害活性

ACE の活性は、基質から生じる馬尿酸を HPLC で測定する方法によって評価した。反応液におけるフラボノイド類の濃度を 250 μM とかなり高めに設定し、ACE 阻害活性を比較した。その結果、アグリコンの中ではケルセチンが最も強い ACE 阻害活性 (31%) を示し、ケンフェロールやルテオリン、アピゲニン等が 50%程度で中等度の阻害作用を示した。ダイゼインやゲニステイン等のイソフラボンアグリコンの阻害活性は、それらよりさらに

低い活性であった。本研究では、合成によって得たナリンゲニン-硫酸、アピゲニン-硫酸、ルテオリン-硫酸、ケンフェロール-硫酸、ケルセチン-硫酸並びにケルセチン-グルクロニド、イソラムネチン-グルクロニドについて、ACE 阻害活性を測定したが、図 10 に示したとおりいずれもアグリコンより低い阻害活性であった。

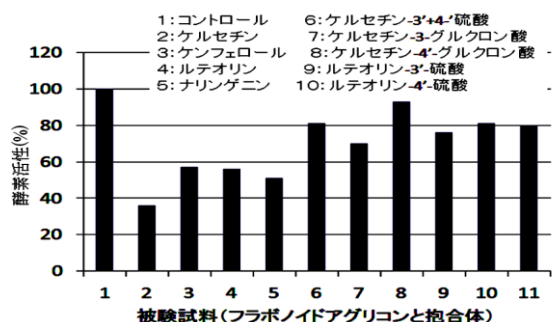


図 10. フラボノイドの ACE 阻害活性の比較

(4) まとめ

フラバノンのナリンゲニン、フラボンのアピゲニン、ルテオリン、フラボノールのケンフェロール、ケルセチン、イソフラボンのダイゼイン、ゲニステイン等のフラボノイドの硫酸エステル合成法を検討し、定量的に硫酸エステル化する方法を開発した。本法は、簡易かつ簡便な合成法であるため、フラボノイド硫酸抱合体を取得するための優れた合成法であると言える。但し、今回は収率を高める方向で検討したため、7 位や 3 位の水酸基に結合したモノサルフェートが得られにくく、1 分子に複数の硫酸が結合した化合物が得られた。抱合体の生理的な機能性を解明するためには、むし多様なモノサルフェートを分離・分取することが重要であることから、今後はモノサルフェートの取得を目的とした合成法の検討が必要である。

一方、グルクロン酸抱合体については、合成物は得られるものの収率が悪く、その改良が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

①渡辺純、沖智之、竹林純、山崎浩二、津志田藤二郎、抗酸化能測定法である H-ORAC 法の室間共同試験、日本食品科学工学会誌、査読有、Vol. 57、No12.、2010、525-531

②津志田藤二郎、標準となる抗酸化能測定法の選定と抗酸化指標の表示について、食品と開発、査読無、45 巻、No. 6、2010、p4-6

③前田剛希、伊波聡、津志田藤二郎、沖縄伝統野菜のカロテノイドの定量、日本食品科学工学会、査読有、Vol158、No. 3、2011、105-112

〔学会発表〕(計 2 件)

① Tojiro Tsushida、Jun Watanabe、

Development of Unified Method for Measuring Antioxidant Capacity to Use for Food Labeling.、ICoff2011 Taipei、2011 年 11 月 12 日、台北国際コンベンションセンター

②佐伯太郎、津志田藤二郎、フラボノイド抱合体の有機合成に関する研究—特に硫酸抱合体について、日本フードファクター学会、2012 年 11 月 10 日、静岡県男女共同参画センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

津志田 藤二郎 (教授)

研究者番号：000353920

(2)研究分担者

鈴木 建夫 (名誉教授)

研究者番号：80005652

(3)連携研究者

なし。