モミジガサ中の抗変異原活性物質の分離同定

野口幸子*・佐々木弘子*・立屋敷哲**・菅原龍幸*

(*聖徳大学, **女子栄養大学)

Isolation and Identification of Antimutagen from MOMIJIGASA (*Cacalia delphiniifolia*)

Sachiko Noguchi*, Hiroko Sasaki*, Satoshi Tachiyashiki**
and Tatsuyuki Sugahara*

*Seitoku University, 550, Iwase, Matsudo-shi, Chiba, 271-8555

**Kagawa Nutrition University, 3-9-21, Chiyoda, Sakado-shi, Saitama, 350-0288

*〒271-8555 千葉県松戸市岩瀬550

**〒350-0288 埼玉県坂戸市千代田3-9-21

The antimutagenic activity of the extracts of MOMIJIGASA (*Cacalia delphiniifolia*) was assayed using the Ames test with *Salmonella typhimurium* TA98 and the mutagen of Trp-P-1(3-Amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido[4, 3-*b*] indole).

The activity was detected in some of the fractions extracted with Et₂O, EtOAc and *n*-BuOH, suggesting the existence of several active components in MOMIJIGASA.

The fraction extracted with EtOAc, which showed the strongest antimutagenic activity, was separated into 4 fractions by silica gel column chromatography. The third, most abundant fraction with the strongest activity was subjected to reversed phase HPLC with a preparative ODS column that gave 5 separated peaks in the chromatogram. The H-NMR spectrum of the third, most abundant peak showed the presence of caffeic acid and quinic acid moieties with the signal-intensity ratio of 2:1. With the aid of FAB-MS, as well as the chemical shift values of the H-NMR signals, the antimutagen was identified as 3, 5-dicaffeoylquinic acid. At a dose of 0.5mg / plate, the compound with S9mix inhibited by 66% the mutagenicity of Trp-P-1.

1. 緒 言

著者らは山菜、野草、キノコ、米転作新規栽培作物などの未だ十分に研究が行われていない食品素材の機能性について検討を行ってきた。これらのうちスクリーニングテストによって強い抗変異原活性が認められたツクシ(*Equisetum arvense*)、ギョウジャニンニク(*Allium victorialis*)、モミジガサ(*Cacalia delphiniifolia*)について抗変異原活性を再評価した結果、ツクシには認められず

ギョウジャニンニク、モミジガサについては強力な抗変異原活性が認められた。そこで山菜として賞味され、最近では栽培されるようになったモミジガサについて抗変異原活性物質本体の分離同定を行ったので以下の通り報告する。

2. 実験方法

(1) 試 料

1997年から98年にかけて、東京都中央卸売市場より岩

Fig.1 Isolation of antimutagenic compound

* 40cm × 4cm silica gel column(silica gel 60, 70-230mesh, Merck)

Eluent:CHCl₃/MeOH/HOAc/H₂O(70:15:12:3)and EtOAc

Eluated:3ml/min

** Reverse phase HPLC

Preparative column:240mm × 30mm Develosil packed Column

packing lop ODS 24S (NOMURA CHEMICAL)

Eluent:5%HCOOH/MeOH(1:1)

Eluated:0.8ml/min

*** Corresponding to antimutagenic compound

(3,5-dicaffeoylquinic acid)

手県産 5 kg, 宮城県野菜市場より宮城県産 10 kg, 計 15 kg 購入し, 試料とした。各試料は水洗後凍結乾燥し粉砕した後, 抽出に用いた。

(2) 抗変異原活性物質の分離

モミジガサの抗変異原活性物質の抽出には水および有機溶媒を用いた。水抽出は平位¹⁾, 上田ら²⁾の方法に準じて行った。有機溶媒抽出および分画は Fig.1 に示した。すなわち, 溶媒抽出は 70% EtOH 抽出後 Et₂O, EtOAc, n-BuOH を用いて行い, EtOAc 抽出画分において強力な抗変異原活性が認められたため, これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび分取用高速液体クロマトグラフィー (以下分取用 HPLC) により活性成分を単離した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーでは 50 cm × 4 cm カラムにシリカゲル 60 (70-230 mesh, Merck) を充填し用いた。展開溶媒は CHCl₃ / MeOH / HOAc / H₂O = (70 : 15 : 12 : 3) および EtOAc を用いた。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られた各画分の分析は薄層クロマトグラフィー (以下 TLC) によった。薄層にシリカゲル 60 F254 Merck, 展開溶媒はシリカゲルカラムクロマトグラフィーと同様のものを用いて展開した。

分析用 HPLC では, GL Sciences 社製 ODS Column 4.6 mm × 250 mm 分析カラムを, 展開溶媒に 5 % HC-OOH / MeOH (1 : 1) を用い, 流速 0.5 ml / min にて

分析を行った。分取用 HPLC では NOMURA CHEMICAL 社製 Develosil packed Column packing Lop ODS 24S 外径 30 × 240 mm 分取カラムを用い, 流速 : 0.8 ml / min にて分離を行った。

(3) 抗変異原活性物質の同定

モミジガサより得られた各 peak について核磁気共鳴吸収 (NMR) 分光法 (¹H-NMR および ¹³C-NMR), 質量分析法 (高速原子衝突法 (FAB-MS)) により peak の本体を同定した。

¹H-NMR および ¹³C-NMR は日本電子製 JEOL-EX 270 超伝導磁石フーリエ変換 NMR 分光測定装置を用い, 測定時を用いた d 化 MeOH (以下 CD₃OD) を 3,300 ppm とした。各 peak 試料は CD₃OD に溶解し用いた。¹H-NMR は 270 MHz にて, ¹³C-NMR は 67.89 MHz にて, プロトン完全デカップリング法にて測定した。測定時間は ¹H-NMR で 2 ~ 8 分, ¹³C-NMR で 13 ~ 60 時間, 測定温度は 19 ~ 21 °C とした。

FAB-MS は日本電子製 JEOL The MS tration jms-700 を用い, Positive ion mode にて [M + H]⁺, Matrix として 3-nitrobenzyl alcohol を用いて測定した。

(4) モミジガサの抗変異原活性の測定

Salmonella typhimurium を用いた Ames Test により抗変異原活性を測定した。菌株は東京都立衛生研究所より分譲を受けた *S. typhimurium* TA98 菌株を用い, 標準変異原物質に Trp-P-1 (3-Amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b] indole) を用いた。

水抽出物の抗変異原活性の測定は平位¹⁾, 上田ら²⁾の方法に準じて行った。抗変異原活性の判定は, 同時に用いた Trp-P-1 の変異原性に対する変異原抑制率として次式により求めた。

$$\text{変異原抑制率 (\%)} = ((C - S) / C) * 100$$

C : 陽性対照平板の復帰変異コロニー数

S : 試料群平板の復帰変異コロニー数

溶媒抽出画分の抗変異原活性の測定は Ames らの原法³⁾, D. Maron⁴⁾, 賀田ら⁵⁾, 矢作⁶⁾の方法を参考にを行い, Fig.2 に示した。各抽出物の変異原性および抗変異原活性の判定は前記水抽出物の判定に準じた。

3. 結果および考察

(1) 抗変異原活性物質の分離・同定

カラムクロマトグラフィーの結果, 画分 A (草色), B (黄褐色), C (濃草色), EtOAc による溶出画分 D の合計 4 つの画分を得た。それぞれの画分を TLC により組成を調べた結果, 画分 A は Rf 0.97 (緑色, 365 nm

Fig. 2 Assay of antimutagenic activity

* Positive control : Using only DMSO as a substitute for solution of sample

Fig. 3 HPLC eluted curb of fraction C

Reverse phase HPLC

Preparative column : 240mm×30mm Develosil packed Column
packing lop ODS 24S (NOMURA CHE-
MICAL)

Eluent : 5 %HCOOH / MeOH (1 : 1)

Eluated : 0.8ml / min

下で赤色), Rf0.98 (草色, 365nm下で赤色) の計 2 つのスポットを呈した. 画分 B は Rf0.09 (茶色), Rf0.19 (黄色, 365nm 下で水色), Rf0.25 (365nm 下で水色) の計 3 つのスポットを呈した. 画分 C は Rf0.23 (黄色, 365nm 下で水色), Rf0.25 (365nm 下水色), Rf0.50

(365nm 下で水色), Rf0.68 (365nm 下で水色) の計 4 つのスポットを示した. 画分 D は Rf0.15 (黄色), Rf0.18 (365nm 下で水色) の計 2 つのスポットを呈した. これらの画分のうち, 最も収量が多く, 確認されたスポットすべてが 365 nm 下で色を呈した画分 C について更に分取用 HPLC により 5 つの peak (1 ~ 5) を分離した. 画分 C の分取用 HPLC, 350nm における溶離曲線を Fig.3 に示した.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) および $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) 化学シフト (δ ppm) による同定にはプロポリス中の isochlorogenic acid についての報告⁷⁾, およびコーヒー豆中の isochlorogenic acid についての報告⁸⁾, *Arnica Montana* と *Arnica Chamissonis* 中の isochlorogenic acid についての報告⁹⁾, *Chrysothamnus Paniculatus* 中の isochlorogenic acid についての報告¹⁰⁾ 等¹¹⁾ に従った.

分離した peak のうち最大であった peak3 は $^1\text{H-}$

Fig. 4 The structure of 3, 5-dicaffeoylquinic acid

Fig. 5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the component corresponding to peak 3

Table 1 ^1H -NMR Spectral Data of the Component Corresponding to peak 3 (270MHz, CD_3OD)

Chemical shift (δ ppm)			
H-2	2.323-2.014	(m)	
H-3	5.405	(d)	
H-4	3.940	(dd)	
H-5	5.455	(d)	
H-6	2.323-2.014	(m)	
H-2' H-2''	6.380, 6.286	(d)	
H-3' H-3''	7.612, 7.580	(d)	
H-5' H-5''	7.072, 7.059	(d)	
H-8' H-8''	6.777	(d)	
H-9' H-9''	6.873	(dd)	
coupling constant (Hz)			
J3,4	3.30		
J4,5	8.58		
J2',3' J2'',3''	15.84		
J5',9' J5'',9''	1.98		
J8',9' J8'',9''	8.08		

NMR (CD_3OD) 化学シフト (δ ppm) に, カフェ酸由来化学シフト (δ ppm) (H-2', 2'': 6.4-6.6 (d), H'-3, 3'': 7.5-7.6 (d), H-5', 5'': 7.0 (d), H-8', 8'': 6.7 (d), H-9', 9'': 6.8 (dd)) とキナ酸由来化学シフト (δ ppm) (H-2, 6: 2.0-2.3 (m), H-3: 5.4 (d), H-4: 3.9 (dd), H-5: 5.4 (d))

が確認され, ^1H -NMR におけるシグナル強度と FAB-MS 測定により分子量516であると確認されたことからカフェ酸:キナ酸 (2:1) の, 3, 5-dicaffeoylquinic acid (Fig.4) であると同定した. peak3の ^1H -NMR (CD_3OD) δ ppm とそのスピン結合定数 (coupling constant (Hz)) を Fig.5, Table 1に, FAB-MS スペクトルを Fig.6に示した.

また, peak2, 4, 5もカフェ酸とキナ酸から構成される caffeoylquinic acid であり, peak2はカフェ酸1分子とキナ酸1分子からなる isochlorogenic acid, peak4, 5はカフェ酸2分子とキナ酸1分子からなる dicaffeoylquinic acid であると推察される. peak1は ^1H -NMR における化学シフトよりギ酸であった.

(2) モミジガサの抗変異原活性

モミジガサ水抽出物は Trp-P-1の変異原性を91%抑制した. これは平位¹⁾, 上田ら²⁾の報告同様, 強い抗変異原活性であった. モミジガサ溶媒抽出物の抗変異原性試験の結果は Table2~6に示した. 溶媒抽出物のうち EtOAc 抽出画分は0.5mg/plate 以上において高い抗変異原活性を示した.

EtOAc 抽出画分を用いたカラムクロマトグラフィーより得られた画分のうち収量が最大であった画分Cは

Fig. 6 FAB-MS spectrum of the component corresponding to peak 3

Table2 Antimutagenic activity of Et₂O extract of *Cacalia delphiniifolia* against 0.02 µg of Trp-P-1

	Dose of extract (mg/plate)	Number of His ⁺ revertant colonies*	Inhibition of mutagen** (%)
positive control	0	273	0
	0.5	145	47
	5	15	95

The data in the table are averages of two plates

* *Salmonella typhimurium* TA98

** ((C-S) / C) × 100

C: Number of His⁺revertant colonies of positive control

S: Number of His⁺revertant colonies of test sample

Table3 Antimutagenic activity of EtOAc extract of *Cacalia delphiniifolia* against 0.02 µg of Trp-P-1

	Dose of extract (mg / plate)	Number of His ⁺ revertant colonies*	Inhibition of mutagen** (%)
positive control	0	344	0
	0.5	136	60
	1	118	66
	5	65	81

The data in the table are averages of two plates

* *Salmonella typhimurium* TA98

** ((C-S) / C) × 100

C: Number of His⁺revertant colonies of positive control

S: Number of His⁺revertant colonies of test sample

Table 4 Antimutagenic activity of n-BuOH extract of *Cacalia delphiniifolia* against 0.02 µg of Trp-P-1

	Dose of extract (mg / plate)	Number of His ⁺ revertant colonies*	Inhibition of mutagen** (%)
positive control	0	344	0
	0.5	199	42
	1	166	52
	5	141	59

The data in the table are averages of two plates

* *Salmonella typhimurium* TA98

** ((C-S) / C) × 100

C: Number of His⁺revertant colonies of positive control

S: Number of His⁺revertant colonies of test sample

0.05mg/plate 以上において抗変異原性を示した. 分取用 HPLC により得られた peak のうち最大の peak であった peak3は0.5mg/plate において抗変異原性を示したが, HPLC による分取以前の画分 C の抗変異原活性が強いことから, 画分 C には peak3以外にも抗変異原性を有するものが存在すると推察される.

食品成分としての 3, 5 - dicaffeoylquinic acid はプロ

Table5 Antimutagenic activity of fractions of Silica gel column chromatography against 0.02 µg of Trp-P-1

	Dose of extract (mg / plate)	Number of His ⁺ revertant colonies*	Inhibition of mutagen** (%)
positive control	0	316	0
Fraction A	0.05	231	27
	0.1	221	30
	0.5	93	71
	1	41	87
B	0.05	263	17
	0.1	281	11
	0.5	296	6
	1	313	1
C	0.05	27	91
	0.1	32	90
	0.5	24	92
	1	34	89
D	0.05	30	91
	0.1	26	92
	0.5	22	93
	1	34	89

The data in the table are averages of two plates

* *Salmonella typhimurium* TA98

** ((C-S) / C) × 100

C: Number of His⁺revertant colonies of positive control

S: Number of His⁺revertant colonies of test sample

Table6 Antimutagenic activity against 0.02 µg Trp-P-1 of the fraction corresponding to peak 3 in the chromatography of HPLC

	Dose of extract (mg / plate)	Number of His ⁺ revertant colonies*	Inhibition of mutagen** (%)
positive control	0	386	0
	0.05	312	19
	0.1	246	36
	0.5	133	66
	1	125	68

The data in the table are averages of two plates

* *Salmonella typhimurium* TA98

** ((C-S) / C) × 100

C: Number of His⁺revertant colonies of positive control

S: Number of His⁺revertant colonies of test sample

ポリス⁷⁾やコーヒー豆⁸⁾にその存在が確認されている. ただし, その抗変異原活性についてはこれまで明らかにされておらず, 本報告が初めての報告と考えられる.

モミジガサ中の抗変異原活性成分同様, ポリフェノール類を多く含むと考えられる茶抽出物については抗酸化性と抗変異原活性を併せ持つという報告がある¹²⁾. また, 食用植物の抗酸化性についてスクリーニングを行った春

日ら¹³⁾はモミジガサに強い抗酸化性があると報告している。このことからモミジガサ中の抗変異原活性成分が抗酸化性等の機能性を持つ可能性があるものと考えられる。そのため今後更に各種の機能性について検討したい。

要 約

トリプトファンの加熱分解により生成される変異原物質 Trp-P-1 に対する抗変異原活性物質の分離同定についてモミジガサを用いて行った。試料は水または有機溶媒抽出を行い、各種クロマトグラフィーにより分離し、NMR 及び FAB-MS により本体の同定を行った。抗変異原活性の判定は賀田らの方法を参考に *S. typhimurium* TA98 菌株を用いた Ames Test によった。溶媒抽出試料はプレート当たり 0.05 - 5 mg の範囲で用いた。抗変異原活性および抗変異原活性本体の分離同定の結果を以下に示した。

- (1) モミジガサ水抽出物は Trp-P-1, 0.04 μ g に対し 91% と食用山野草についての既報¹⁾, ²⁾同様強力な抗変異原活性を示した。また有機溶媒抽出で得られた各画分では, Trp-P-1, 0.02 μ g に対し Et₂O 抽出画分 5 mg で 95%, EtOAc 抽出画分 0.5mg で 60%, BuOH 抽出画分 1 mg で 52% の抗変異原活性を示した。
- (2) EtOAc 抽出画分を用いたカラムクロマトグラフィーにより得られた画分 A - D では画分 C・D において 0.05mg で 91% の抗変異原活性を示した。
- (3) 画分 C を用いた分取用 HPLC により得られた peak

1 から 5 では peak 3 において 0.5mg で 66% の抗変異原活性を示した。

- (4) ¹H-NMR, ¹³C-NMR 及び FAB-MS により peak 3 から 5 は分子量 516, カフェ酸 2 分子とキナ酸 1 分子からなる dicaffeoylquinic acid, 特に peak3 は 3, 5-dicaffeoylquinic acid と同定した。残る peak2 は ¹H-NMR より isochlorogenic acid と推察される。

参考文献

- 1) 平位信子：1989年度女子栄養大学大学院修士論文（1990）
- 2) 上田成子, 桑原祥浩, 平位信子, 佐々木弘子, 菅原龍幸：日本食品工業学会誌, **38** (6), 507 (1991)
- 3) D. M. Maron, B. N. Ames : *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983)
- 4) D. M. Maron, J. Katzenellenbogen, B. N. Ames : *Mutat. Res.*, **88**, 343 (1981)
- 5) T. Kada, K. Morita, T. Inoue : *Mutat. Res.*, **53**, 351 (1978)
- 6) 矢作多貴江：蛋白 核酸 酵素, **20** (13), 1178 (1975)
- 7) T. Tatefuji, N. Izumi, T. Ohta, S. Arai, M. Ikeda and M. Kurimoto : *Biol. Pharm. Bull.*, **19** (7), 966 (1996)
- 8) H. Morishita, H. Iwahashi, N. Osaka and R. Kida : *J. Chromatography*, **315**, 253 (1984)
- 9) I. Merfort : *Phytochemistry*, **31** (6), 211 (1992)
- 10) B. N. Timmermann, J. J. Hoffmann, S. D. Jolad, K. H. Schram, R. E. Klenck, and R. B. Bates : *J. Natural Products*, **46** (3), 365 (1983)
- 11) E. Scholz, M. Heinrich, D. Hunkler : *Planta Med.*, **60**, 360 (1994)
- 12) G. C. Yen, H. Y. Chen : *J. Agric. Food Chem.*, **43** (1), 27 (1995)
- 13) 春日敦子, 青柳康夫, 菅原龍幸：日本食品工業学会誌, **35** (12), 828 (1988)