

ヒエ子実から単離された抗酸化成分としてのセロトニン誘導体

渡辺 満・中村 信吾・小綿美環子・安井 明美

(東北農業試験場)

Serotonin Derivative as an Antioxidant from Japanese Barnyard Millet (*Echinochloa utilis*) Grains

Mitsuru WATANABE, Shingo NAKAMURA, Miwako KOWATA and Akemi YASUI

(Tohoku National Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

ヒエは雑穀類の中でも最も貯蔵性が高く、古くから救荒作物として重要な位置付けにあった。特に東北、北海道といった寒冷地方では栽培量が多く、料理法も多彩で欠かさない作物であった。しかし食生活の変化に伴い、栽培量・栽培面積は1970年の農業統計資料に記載されないほどにまで減少した。近年になり、栄養豊富な健康食品として、またコメやコムギに対するアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー患者の代用食品として、利用が増加している。本研究では、ヒエ子実の健康への寄与に関する成分の知見を得ることを目的として、抗酸化成分の検索を行った。

2 試験方法

(1) ヒエ子実エタノール抽出物の抗酸化活性の品種間差異：代表的なヒエ「早生白」等8品種、いずれも1994年度東北農試で栽培・収穫（図1参照）、を供試して、子実20mgからのエタノール抽出物の抗酸化活性（AMVNを反応開始剤とした過酸化脂質生成阻害活性）を測定した。

(2) 黒稗子実からの抗酸化成分の単離及び同定：黒稗子実は1998年度、東北農試で栽培・収穫したものを使用した。子実は粉碎後、エタノールで還流加熱抽出し、ろ過・濃縮したものを粗抽出物とした。これを Sephadex LH-20 クロマトグラフィーに添加し、エタノールを溶離液として溶出、280及び350nmの吸光度を測定し、分画した。分画したフラクションの一部を、ODS カラム、ポリマーベスカラムを接続した分取 HPLC により、水-メタノールの直線濃度勾配、メタノールによりそれぞれ溶出、主要ピークを回収した。検出は280nmで行った。単離した化合物は、核磁気共鳴装置（NMR）、質量分析装置（MS）、フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）の機器分析により、構造解析を行った。また、インドール基の検出は、インドール基、ピロール基の検出試薬であるエーリッヒ試薬（5% p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 10% 硫酸溶液）により行った。

3 試験結果及び考察

(1) ヒエ子実エタノール抽出物の抗酸化活性の品種間差異

供試した全てのヒエ抽出物に活性が認められた（図1）が、中でも、黒稗抽出物の活性が他の品種と比較して著しく高かった。このことから、抗酸化物質の検索には黒稗を用いることにした。

(2) 黒稗からの抗酸化物質の単離及びその活性

粗抽出物は Sephadex LH-20 クロマトグラフィーに添加、溶出し、A-Hのフラクションに分画した。これらフラクションにはいずれも活性は認められたが、フェノー

ル性化合物の含量がもっとも高いと推測されたフラクションFについて、分取 HPLC の繰り返しにより、主要ピークを回収し、3つの化合物（化合物1、3、4）を単離した。これら化合物の活性（最終濃度 $4.2 \times 10^{-3} \% \text{ wt/v}$ ）を図2に示す。得られた中では化合物1の活性が最も高く、強力な合成抗酸化剤である BHA に近い活性が認められた。化合物3は実験初期の活性はケルセチンよりわずかに低かったが、反応時間135分以降の過酸化脂質生成量はケルセチンよりも低く、ケルセチンより高い活性を示した。このことは、化合物3の抗酸化剤としての作用時間はケルセチンより長いことを意味する。化合物4はケルセチンよりも、わずかに活性が低かった。最も活性の高かった化合物1について、構造解析により同定を行った。

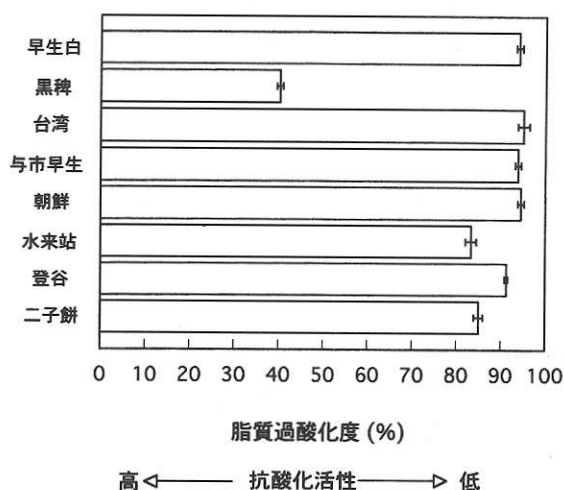


図1 ヒエ子実エタノール抽出物の抗酸化活性の品種間差異

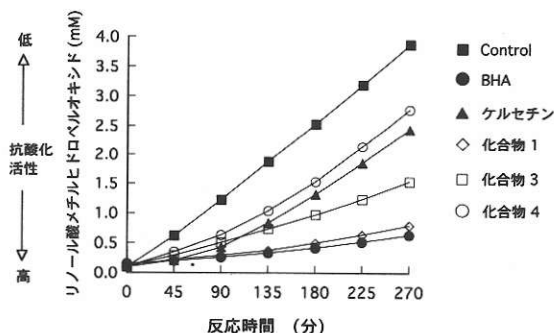


図2 ヒエ子実単離化合物の抗酸化活性

(3) 化合物1の同定

化合物1の ^1H NMRのデータ(表1)では、オルト(9 Hz)及びメタの(2 Hz)位置関係にあるプロトン、及びトランス配置のビシナルプロトン(14 Hz)の存在が認められた。また、 ^{13}C NMRのデータ(表2)と併せて、*p*-ヒドロキシフェニル基の存在も推定された。 ^{13}C NMRのデータからは、カルボニル基及び2つのメチレン基の存在が推測された。

表1 化合物1の ^1H NMR データ DMSO- d_6 で測定 (J, Hertz)

H-1	7.05d (2)
H-4	6.86d (2)
H-6	6.60d (2, 9)
H-7	7.12d (9)
H-9	2.79t (7)
H-10	3.43q (7)
H-2'	7.38d (9)
H-3'	6.79d (9)
H-5'	6.79d (9)
H-6'	7.38d (9)
H-7'	7.33d (14)
H-8'	6.41d (14)

表2 化合物1及びセロトニンの ^{13}C NMR データ。アセトン- d_6 +D $_2$ Oで測定

	化合物1	セロトニン
C-1	124.0	124.9
C-2	111.6	108.9
C-3	128.4	127.9
C-4	103.0	102.7
C-5	149.8	149.9
C-6	111.7	112.0
C-7	112.4	112.7
C-8	131.9	131.9
C-9	25.2	23.3
C-10	40.3	40.2
C-1'	126.9	
C-2'	130.1	
C-3'	116.2	
C-4'	158.8	
C-5'	116.2	
C-6'	130.1	
C-7'	140.7	
C-8'	118.2	
C-9'	168.0	

さらに、COLOC(図3)で検出された相関信号から、本化合物は*p*-クマール酸残基を含むことが確認された。また、メタノール溶液がエーリッヒ試薬により、濃青色に発色したこと、及び ^{13}C NMRのデータで示された炭素数から、インドール基の存在が推定された。これと併せて2つのメチレン基、及びオルト、メタの位置関係にあるプロトンの存在から、セロトニン残基が存在することが示唆された。そこで、セロトニンと ^{13}C NMRスペクトルを比較すると、きわめてよく一致する(表2)ことから、本化合物はセロトニン残基を含むことが確認された。また、FT-IRのデータ(1651 ^{-1}cm)からは-CO-NH-基の存在が示され、FAB-MS実験により、323 [M+H] $^{+}$ の分子イオンが検出された。以上の結果から、本化合物は*N*-(*p*-クマロイル)セロトニンと同定された(図4)。

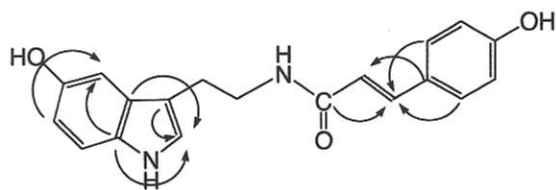
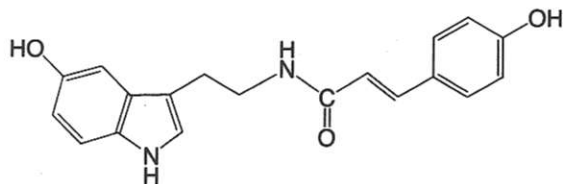


図3 COLOC実験により検出された化合物1の相関信号



N-(*p*-クマロイル)セロトニン

図4 化合物1の構造式

4 ま と め

黒稗子実のエタノール抽出物から3つの抗酸化化合物を単離した。そのうち最も強力な活性を持つ化合物1の構造解析を行い、*N*-(*p*-クマロイル)セロトニンと同定した。本化合物はヒエズ実からは初めて単離された化合物であり、これまでに紅花(*Carthamus tinctorius* L.)からのみ単離例が報告されている^{2,3)}。*N*-(*p*-クマロイル)セロトニンには他の抗酸化能の評価系でも高い活性が検出されている³⁾が、その他にも、ヒト単球からの炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-1, IL-6)産生の阻害活性、すなわち抗アレルギー活性が確認されている¹⁾ことから、アトピー性皮膚炎をはじめとする、コメやコムギに対するアレルギー患者の代用食品として、さらに利用価値が高まることが期待される。

引 用 文 献

- 1) Kawashima, S.; Hayashi, M.; Takii, T.; Kimura, H.; Zhang, H. L.; Nagatsu, A.; Sakakibara, J.; Murata, K.; Oomoto, Y.; Onozaki, K. 1998. Serotonin derivative, *N*-(*p*-coumaroyl)serotonin, inhibits the production of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , and IL-6 by endotoxin-stimulated human blood monocytes. *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 423-428.
- 2) Sakamura, S.; Terayama, Y.; Kawakatsu, S.; Ichihara, A.; Saito, H. 1980. Conjugated serotonins and phenolic constituents in safflower seed (*Carthamus tinctorius* L.). *Agric. Biol. Chem.* 44(12): 2951-2954.
- 3) Zhang, H. L.; Nagatsu, A.; Watanabe, T.; Sakakibara, J.; Okuyama, H. 1997. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem. Pharm. Bull.* 45(12): 1910-1914.