

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3706906号
(P3706906)

(45) 発行日 平成17年10月19日(2005.10.19)

(24) 登録日 平成17年8月12日(2005.8.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C07C 229/22
A23L 1/30
A61K 7/00
A61K 31/216
A61K 35/78

C O 7 C 229/22
A 2 3 L 1/30
A 6 1 K 7/00
A 6 1 K 7/00
A 6 1 K 31/216

B
C
K

請求項の数 6 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-385896 (P2001-385896)
(22) 出願日 平成13年12月19日(2001.12.19)
(65) 公開番号 特開2003-183231 (P2003-183231A)
(43) 公開日 平成15年7月3日(2003.7.3)
審査請求日 平成13年12月19日(2001.12.19)

(73) 特許権者 501203344
独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
茨城県つくば市観音台3-1-1
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74) 代理人 100101904
弁理士 島村 直己
(72) 発明者 木村 俊之
福島県福島市荒井字檀ノ腰30-5 農試
宿舍204

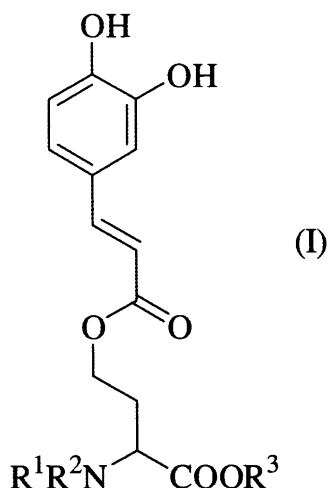
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カフェオイルホモセリン及びラジカル消去剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(1)：



10

(式中、R¹、R²及びR³は水素、C₁～C₅アルキル基、又は-CO-R⁴(R⁴はC₁～C₅アルキル基を

20

表す。)を表す。)で示される化合物又はその塩。

【請求項 2】

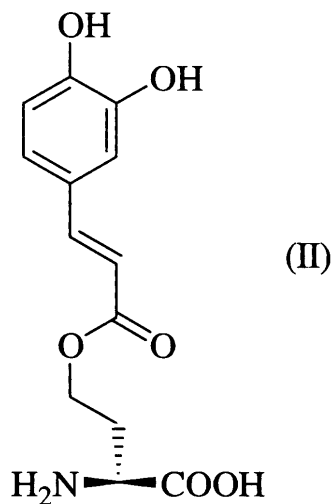
R¹、R²及びR³が水素である請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の化合物を含有するラジカル消去剤。

【請求項 4】

クサソテツ属(Matteuccia)植物からの式(II)：



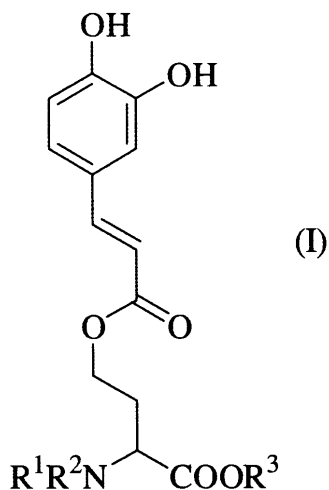
10

20

の化合物又はその塩を含む水溶性抽出物を含有するラジカル消去剤。

【請求項 5】

クサソテツ属(Matteuccia)植物から抽出することを特徴とする下記式(I)：



30

40

(式中、R¹、R²及びR³は水素、C₁～C₅アルキル基、又は-CO-R⁴(R⁴はC₁～C₅アルキル基を表す。)を表す。)で示される化合物又はその塩の製造方法。

【請求項 6】

R¹、R²及びR³が水素である請求項 5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、食品産業分野、化学産業分野等において有用な新規 L-0-カフェオイルホモセ

50

リン及びラジカル消去剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

クロロゲン酸等、コーヒー酸等を骨格にもつフェノール酸化合物は天然抗酸化剤、ラジカル消去剤として知られており、食品の酸化防止の他、生体のラジカル消去剤としての報告がある。しかしながら、これらは疎水の性質が強く、水にはほとんど溶解しない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、親水性で、食品用の抗酸化剤などとして有用な化合物、及びその製造方法、並びに該化合物を有効成分として含有するラジカル消去剤を提供することを目的とする。

10

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、東北地域の400種類以上にものぼる農産物を対象に広くラジカル消去活性をスクリーニングしてきた。その結果、東北地域の代表的な山菜であるクサソテツに強い活性があることを見出し、強力なラジカル消去活性を有する化合物の単離に成功した。

【0005】

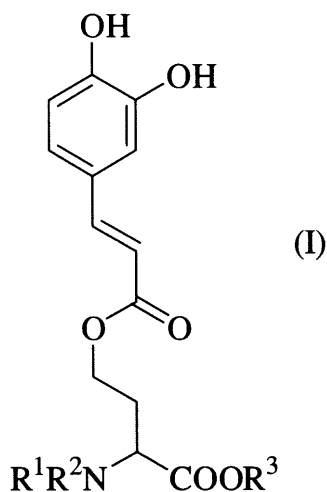
即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 下記式(1)：

【0006】

【化3】

20



30

(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_5$ アルキル基、又は $-CO-R^4$ (R^4 は $C_1 \sim C_5$ アルキル基を表す。)を表す。)で示される化合物又はその塩。

(2) 前記(1)に記載の化合物を有効成分として含有するラジカル消去剤。

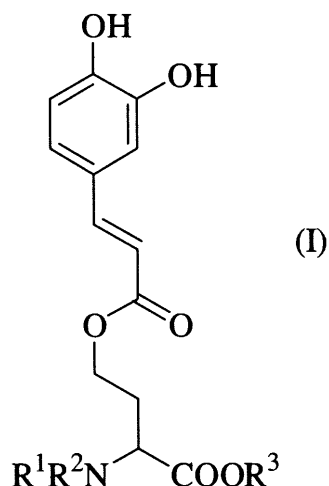
(3) クサソテツ属(Matteuccia)植物の水溶性抽出物を含有するラジカル消去剤。

(4) クサソテツ属(Matteuccia)植物から抽出することを特徴とする下記式(1)：

40

【0007】

【化4】



10

(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_5$ アルキル基、又は $-CO-R^4$ (R^4 は $C_1 \sim C_5$ アルキル基を表す。)を表す。)で示される化合物又はその塩の製造方法。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明について詳しく説明する。

20

クサソテツ(別名:コゴミ)はオシダ科の多年草のシダで、北半球の温帯地域に広く分布しており、日本では北海道、本州、四国、九州の日当たりのよい原野の湿った場所に群生する。また、早春の融雪後まもなく芽を出した葉先がまいた状態の若い葉は食用となる。

【0009】

クサソテツの健康機能についてはこれまで報告されていなかったが、本発明者らはクサソテツが強いラジカル消去活性を有することを見出した。クサソテツの抽出液は非常に強いラジカル消去活性を示すことから、この活性成分を明らかにすべく、鋭意検討を重ね、クサソテツに含まれる活性成分を単離し、その化学構造を明らかにすることに成功した。その結果クロロゲン酸、及び、L-0-カフェオイルホモセリンが活性の主成分であると同定した。その一つのL-0-カフェオイルホモセリンは文献未記載の新規な化合物であり、本発明者らが新たに見出したものである。

30

【0010】

請求項1に係る本発明は、上記一般式(I)で表される化合物である。上記一般式(I)で表される化合物は、アミノ酸の一種であるホモセリンの-水酸基とカフェ酸とがエステル結合した化合物であって、文献未記載の新規化合物である。

【0011】

一般式(I)において、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_5$ アルキル基、又は $-CO-R^4$ (R^4 は $C_1 \sim C_5$ アルキル基を表す。)を表す。 $C_1 \sim C_5$ アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、イソブチル基等が挙げられる。また、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、ルチノース等の糖類、グルタミン酸、リジン等のアミノ酸であってもよい。本発明では、 R^1 、 R^2 及び R^3 のうち、少なくとも1つは水素であることが好ましく、少なくとも2つが水素であることが更に好ましく、3つとも水素であることが最も好ましい。

40

【0012】

本発明の一般式(I)で表される化合物は、化学的合成法によっても製造することができるが、例えば以下のようにして、一般式(I)で表される化合物を産生する植物から抽出、分離精製して得ることもできる。

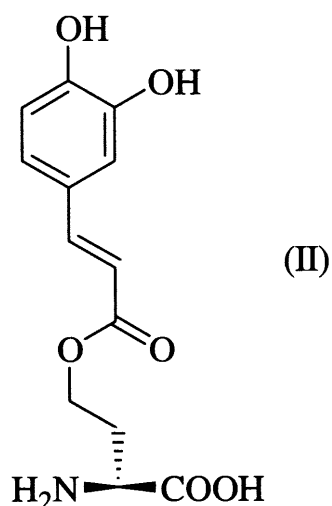
本発明の化合物を生産する植物としては、オシダ科(イワデンダ科)植物、好ましくはクサソテツ属(Matteuccia)に属する植物、例えばクサソテツ(Matteuccia struthiopteris

50

(L.)Todaro)、イヌガンソク (*Matteuccia orientalis*) 等が挙げられる。なお、クサソテツからは、下記式(II)で表される化合物が得られる。

【0013】

【化5】



10

上記式(II)で表される化合物に、慣用の化学合成手法を利用してアミノ酸部分のアミノ基及び/又はカルボキシル基を化学修飾することにより、上記一般式(I)で表される種々の誘導体を得ることができる。

20

以下に、クサソテツから本発明の化合物を抽出する方法について説明する。

【0014】

上記植物を、必要に応じて裁断、破碎、圧搾及び/又はホモジナイズして、植物が十分浸る量の溶媒に浸漬する。また、この抽出工程を、必要に応じて加温しながら行なってもよく、抽出時間は抽出温度に応じて適宜変更してよい。抽出溶媒としては、本化合物は水溶性が高いことから水、又は水溶性・極性の有機溶媒、若しくはこれらの混合溶媒を用いることが好ましい。水溶性又は極性の有機溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール等の水溶性アルコール、アセトン等

30

【0015】

上述のようにして抽出した後に、濾過、分液、遠心分離、減圧濃縮等の慣用の方法を用いて、本発明の化合物等の水溶性抽出物を含む抽出液を得る。この水溶性抽出物を含む抽出液は、これ以上精製することなくそのままラジカル消去剤として用いることもできる。

【0016】

また、さらに精製する場合には、カラムクロマトグラフィー等の通常分離精製手段を適宜組み合わせ、上述の抽出液から一般式(I)で表される化合物を単離することができる。例えば、得られた抽出液をODSのカラムに通し、メタノールの濃度勾配をかけて溶出させて紫外吸収を指標にポリフェノールの画分を得る。この画分に含まれる成分を分取

40

【0017】

本発明の化合物は、強いラジカル消去活性を有する。また、本発明の化合物は、古くから山菜として食用とされているクサソテツより得られるため、安全性の上でも問題がない。また、アミノ酸のアミノ基、カルボキシル基の親水基を有していることから水溶性である特徴を有する。クサソテツから得られる一般式(II)で表される化合物だけでなく、その誘導体、光学異性体、及びその塩も同様にラジカル消去活性を有する。塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、メタンシルホン酸塩、トルエンシルホン酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、マレイ

50

ン酸塩等が挙げられる。

【0018】

本発明の一般式(Ⅰ)で表される化合物は、例えば食品分野、化粧品分野及び農薬・医薬品分野等のラジカル消去剤(ラジカル補足剤)として有用である。食品分野又は化粧品分野で用いる場合には、食品又は化粧品中に本発明の化合物を0.001~50重量%含有させることが好ましく、また、医薬品として人体に投与する場合には、成人一日当たり0.01~10000mgを投与することが好ましい。

【0019】

本発明の化合物は、単独で用いてもよいし、又は食品分野、化粧品分野及び農薬・医薬品分野等で通常用いられる他の成分と組み合わせて組成物として用いてもよい。そのような他の成分としては、例えば、食品分野では、保存料、乳化剤、安定剤、増粘剤、矯味矯臭剤、呈味剤、甘味剤、酸味剤、着色料等が挙げられ、化粧品分野では、ワセリンやマイクロクリスタリンワックス等のような炭化水素類、ホホバ油やゲイロウ等のエステル類、牛脂、オリーブ油等のトリグリセライド類、セタノール、オレイルアルコール等の高級アルコール類、ステアリン酸、オレイン酸等の脂肪酸、グリセリンや1,3-ブタンジオール等の多価アルコール類、非イオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、エタノール、カーボポール等の増粘剤、防腐剤、紫外線吸収剤、抗酸化剤、色素、粉体類等が挙げられ、医薬品分野では、賦形剤、結合剤、被覆剤、滑沢剤、糖衣剤、崩壊剤、増量剤、矯味矯臭剤、乳化・可溶化・分散剤、安定剤、pH調整剤、等張剤等が挙げられる。

【0020】

従来の抗酸化剤、ラジカル消去剤が疎水性であるのに対し、本発明の新規化合物(Ⅰ)は水溶性であり、現在、水溶性の抗酸化剤、ラジカル消去剤が強く望まれる中、本発明の化合物は非常に有用性が高い。これを例えば食品に添加することにより、食品の酸化を抑制することができる。また、親油性ラジカル消去剤、例えば、ビタミンE、ビタミンAとの相乗作用も期待でき、効率的に食品の酸化が抑制される。この他、本発明の化合物を摂取、又は投与することにより、体内で老化、生活習慣病を引き起こすといわれている活性酸素種を消去することが期待される。

【0021】

【実施例】

次に本発明を実施例によって詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1)クサソテツからの本発明の化合物の単離

クサソテツのラジカル消去活性を指標にして分離精製を進めた。

クサソテツ2kgにメタノールを加えてホモジナイズした。濾紙で吸引濾過し、濾液を遠心分離(5000rpm×10min)し、約10Lの上清を得た。これを減圧濃縮しメタノールを除去した。得られた濃縮液を更に遠心分離し、上清をフィルター濾過し、濾液をODS(INERTSIL PREP-ODS, 20×250mm, GLサイエンス社)カラムクロマトグラフィー(流速7ml/min、水/メタノール 10/90~0/100の直線濃度勾配、40min)で溶出をおこなった。分画は14mlずつ行い、各々の画分についてラジカル消去試験を行った。活性が見られた2つの画分のうち、後半に溶出されるピークはクサソテツのもう一つのラジカル消去活性の主体成分であるクロロゲン酸であった。前半に溶出される活性ピークを更にカラムに通し、280nmにおける紫外線吸収で単独ピークになったことを確認し、これを再結晶し白色の結晶を得ることができた。

【0022】

(実施例2)クサソテツから単離した本発明の化合物の構造解析

得られた化合物が、上記一般式(Ⅰ)で表される化学構造であることを下記のようにして確認した。

上記実施例1で得られた化合物について、NMR(核磁気共鳴)及びMS(質量分析法)により、構造解析を行った。以下に、各データを示す。

10

20

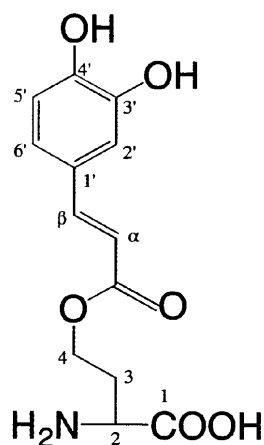
30

40

50

【 0 0 2 3 】

【 表 1 】



Carbon	δ_{H} ($J=\text{Hz}$)	δ_{C}
1		173.8
2	3.69, <i>dd</i> (7.6, 5.2)	54.0
3a	2.15, <i>dq</i> (12.1, 6.2)	31.6
3b	2.35, <i>dq</i> (13.7, 6.9)	
4	4.34, <i>t</i> (5.8)	62.2
Caffeoyl		
C=O		169.1
α	6.30, <i>d</i> (15.9)	114.9
β	7.58, <i>d</i> (15.9)	147.4
1'		127.8
2'	7.05, <i>d</i> (1.7)	115.4
3'		146.9
4'		149.7
5'	6.78, <i>d</i> (8.2)	116.6
6'	6.95, <i>dd</i> (8.1, 1.7)	123.1

ネガティブ高分解能質量分析 (HRESIMS) :

m/z 280.0835 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$, 計算値280.08156)

同様にネガティブHRESIMSでインソースCID(Collision Induced Dissociation)によるフラグメンテーションによって得られたピーク :

m/z 179.0376 ($\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4$, 計算値179.03389), 135.0484 ($\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2$, 計算値135.04406)

【 0 0 2 4 】

10

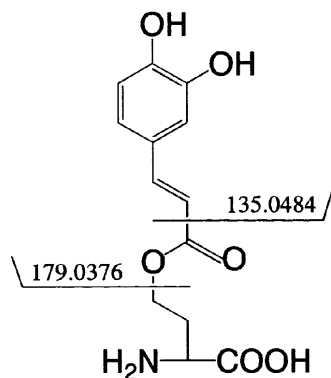
20

30

40

50

【化6】



10

この結果、上記実施例1で得られた化合物は、前記式(11)で表される化合物であることが同定された。

【0025】

(実施例3) クサソテツから単離した本発明の化合物のラジカル消去活性試験
 上記実施例1で得られた化合物について、DPPH(ジフェニルピクリルヒドラジル)ラジカル消去法、及び、化学発光法によるラジカル消去活性試験を行った。2つの原理の異なる方法を組み合わせることにより、より正確なラジカル消去活性を知ることができるが、他の測定法を用いることもできる。

20

1 DPPHラジカル消去法

クサソテツより単離した本発明の化合物の10mM/DMSO溶液を調製し、これを更に1.78倍ずつ0.01mMまでDMSOを用いて希釈していく。この希釈したサンプルを96穴プレートに15μlずつ分注し、その後200μMのDPPH/50%エタノール水溶液を175μl分注し、5分間室温で攪拌し、その後550nmにおける吸光度を測定する。

活性は、サンプルがDPPHの550nmの吸光度を、無添加の時に対し50%にまで減少させるときのサンプルの濃度を没食子酸の時に相当する濃度で示す。

【0026】

2 化学発光法

DPPHラジカル消去法と同じく、クサソテツより単離した本発明の化合物の10mM/DMSO溶液を調製し、これを更に1.78倍ずつ0.01mMまでDMSOを用いて希釈していく。この希釈したサンプルを96穴プレートに10μlずつ分注し、その後、100μlのキサンチン、MCLA(2-メチル-6-[4-メトキシフェニル]-3,7-ジハイドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン)溶液と、100μlのキサンチンオキシダーゼ溶液を添加する。キサンチンとキサンチンオキシダーゼにより、生体内で発生する活性酸素のひとつのスーパーオキシドアニオンを産生させ、これに特異的な発色試薬であるMCLAにより発色させ、この発光強度を測定する。活性はサンプルが無添加の時の発光強度に対し、50%にまで減少させるときのサンプルの濃度をスーパーオキシドアニオンジスムターゼ(SOD)の時に相当する活性で示す。

30

【0027】

これらの結果、上記実施例1で得られた化合物、つまり一般式(1)で表される本発明のL-0-カフェオイルホモセリンは、天然型ラジカル消去剤として知られるクロロゲン酸、ルチン、カフェ酸と同等以上の強力なラジカル消去活性を持つことが分かった。

40

【0028】

【発明の効果】

請求項1に係る本発明により、新規カフェオイルホモセリンが提供される。この新規カフェオイルホモセリンは、アミノ酸のひとつであるホモセリンの水酸基とカフェ酸のカルボキシル基がエステル結合した化合物である。この新規カフェオイルホモセリンはその構造から非常に親水性が高い。これまで知られているポリフェノール系の抗酸化剤は疎水性が高いものが多く、そのため親水性の高い水溶性抗酸化剤が望まれており、本発明の新規

50

カフェオイルホモセリンはその点で注目される。

【0029】

請求項1記載のカフェオイルホモセリンは、請求項2に係る本発明のように、抗酸化剤として有用であり、特に古くから食用とされているクサソテツ（コゴミ）に比較的多量に含まれる成分であるため、食品用の抗酸化剤として用いたときにも安全性の上で問題がない。

【0030】

また、本発明により、水溶性で強力なラジカル消去活性を有する一般式（I）で表される化合物を有効成分として含有するラジカル消去剤を提供できる。クサソテツの水溶性抽出液又は請求項1記載のカフェオイルホモセリンを食品に添加することにより、食品中の油脂エマルジョンなどの酸化が抑制される。すなわち、食品中の油脂エマルジョンにおいて不飽和脂肪酸の酸化などが抑制される。また、その食品摂取後は、体内で抗酸化性を発揮することが期待される。

10

【0031】

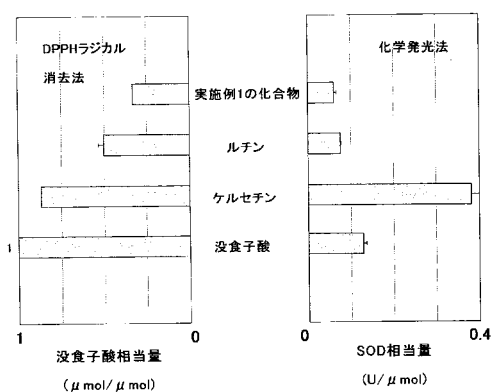
さらに、本発明によりクサソテツから一般式（I）で表される化合物を容易に製造する方法を提供できる。クサソテツ（コゴミ）は、主に東北地方を代表する山菜として食されており、今までは特にその食品としての機能は知られていなかったが、本発明により、抗酸化性を有するカフェオイルホモセリンの原料としての利用も期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】各化合物のラジカル消去活性を比較した図である。

20

【図1】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 K 35/78	X
C 0 7 C 227/28	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 9 K 15/24	C 0 7 C 227/28	
C 0 9 K 15/34	C 0 9 K 15/24	
	C 0 9 K 15/34	

(72)発明者 鈴木 雅博

福島県福島市荒井字檀ノ腰30-5 農試宿舍402-2

(72)発明者 山岸 賢治

福島県福島市荒井字檀ノ腰30-5 農試宿舍2号棟401

(72)発明者 新本 洋士

福島県福島市荒井字檀ノ腰30-5 農試宿舍104

審査官 前田 憲彦

(56)参考文献 国際公開第00/063152(WO, A1)

国際公開第99/048371(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C07C229/00

A23L 1/00

A61K 7/00

A61K 31/00

A61K 35/00

C07C227/00

C09K 15/24

CA(STN)

REGISTRY(STN)