

ヤーコン地上部の抗酸化活性と α -グルコシダーゼ阻害活性に関する成分

寺田澄男,* 伊藤紀久夫, 吉村 朗, 野口直人, 石田 崇

The Constituents Relate to Anti-oxidative and α -Glucosidase Inhibitory Activities in Yacon Aerial Part ExtractSumio TERADA,* Kikuo ITO, Akira YOSHIMURA,
Naoto NOGUCHI, and Takashi ISHIDAResearch Laboratory, Zenyaku Kogyo Co. Ltd., 2-33-7, Ohizumi-machi,
Nerima-ku, Tokyo 178-0062, Japan

(Received March 2, 2006; Accepted May 15, 2006)

Hot water extract of the aerial part of Yacon (*Smallanthus sonchifolia*, Compositae) showed potent free radical-scavenging activity and inhibitory effects on lipid peroxidation in rat brain homogenate. The most potent antioxidative activity focused on the 50% MeOH-eluted fraction on DIAION HP-20 column chromatography. The structure of the major component in the fraction was identified as 2,3,5-tricaffeoylaltaric acid (TCAA) based on spectroscopic evidence. The antioxidative activity of TCAA is superior to that of natural antioxidants such as (\pm)-catechin, α -tocopherol, and ellagic acid, and TCAA also showed selective maltase-inhibitory activity (IC_{50} 49 μ g/ml). As the hypoglycemic activity of Yacon extract was described in a previous report, the present results showing that the aerial part of Yacon has strong antioxidative activity may encourage its potential use as a food supplement to prevent type II diabetes.

Key words—*Smallanthus sonchifolia*; antioxidant; tricaffeoylaltaric acid; α -glucosidase inhibitory activity; Yacon

緒 言

ヤーコン (*Smallanthus sonchifolia*) はアンデス山地原産のキク科植物である。われわれは、ヤーコン地上部熱水エキスに血糖上昇抑制活性を見出し、作用発現に α -グルコシダーゼ阻害活性が関与していること、またエキス中の3,4-ジカフェオイルキナ酸などのジカフェオイルキナ酸 (DCQA) 類が強力かつ選択的な α -グルコシダーゼ阻害活性を有することを報告している。¹⁾

最近、活性酸素が膵臓ランゲルハンス氏島に作用して糖尿病発症を促進し、これが抗酸化物質投与により抑制されることが報告^{2,3)}されている。また、抗酸化活性を有するポリフェノールにより、STZ誘発糖尿病マウスの血糖値が低下することも報告されている。⁴⁾ Caffeic acid や DCQA 類には抗酸化活性のあることが知られている^{5,6)}ことから、ヤーコン地上部エキスについて検討したところ、 α -

tocopherol や (\pm)-catechin に匹敵する強力な抗酸化活性が見出された。活性成分の探索の結果、抗酸化活性は前記の α -グルコシダーゼ阻害活性と同様に、熱水エキスの DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーの 50% MeOH 溶出画分に収斂した。HPLC 分析により、本画分は caffeoyl 基を有するポリフェノール成分の混合物であることが判り、DCQA などの α -グルコシダーゼ阻害活性成分が検出された。同時に、これまで未検出で含量の高い成分が認められたことから精製を行い、既知物質 2,3,5-tricaffeoylaltaric acid (TCAA) を分離した。

本化合物を他の天然物由来の抗酸化活性成分とともに評価し、並びに α -グルコシダーゼ阻害活性について検討したので報告する。

実 験 の 部

NMR は JNM-EX400 (日本電子) にて測定し、内部標準は TMS を用いた。なお、doublet は d, double doublet は dd と各々略した。高分解能 FAB-MS は、JMS-SX102A (日本電子) にて測定

した。UV スペクトルは UV-2550 (島津製作所), 比旋光度は SEPA-300 (堀場製作所) により各々測定した。HPLC はポンプ LC-10Atpv, UV/フォトダイオードアレー検出器 SPD-M10Avp, カラムオープン CTO-10Asvp, システムコントローラー SCL-10Avp (いずれも島津製作所) を用いて行った。

カラムクロマトグラフィー用の担体は, DIAION HP-20 (日本錬水), LiChroprep RP-18 (メルク), TOYOPEARL HW-40F (東ソー), Sephadex LH-20 (アマシャム) を用いた。

1. ヤーコンの栽培 ヤーコンは 2002 年東京都練馬区大泉町 2 丁目の全薬工業株式会社中央研究所圃場にて, 茨城大学農学部月橋輝男教授より恵与頂いたペルー A 系ヤーコンの種芋を用いて栽培した。

2. 脳ホモジネート自動酸化試験 Ohkawa らの方法⁷⁾ に準じて, チオバルビツール酸法により測定した。

3. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕捉試験 Blois らの方法⁸⁾ に準じて測定した。

4. 糖水解酵素阻害活性試験 α -アミラーゼ, マルターゼ, 及びスクラーゼ阻害活性はいずれも前報¹⁾ に記載の方法により測定した。

5. TCAA の分離 ヤーコン地上部 100 g を 1 l の 70°C 熱水で 15 分間攪拌抽出し, 熱時綿栓濾過した。濾液を濃縮・凍結乾燥し, 暗褐色粉末 17.3 g を得た。この全量を DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィー (30 mm ϕ ×200 mm) に付し, 水, 50% MeOH/水, MeOH 各 1 l で順次溶出後, 濃縮して凍結乾燥し, 水溶出部 13.9 g, 50% MeOH/水溶出部 2.21 g, MeOH 溶出部 0.48 g を各々得た。50% MeOH/水溶出部 2.19 g を 2 回に分けて LiChroprep RP-18 カラムクロマトグラフィー (35 mm ϕ ×370 mm) に付し, MeOH-5% 酢酸 (3:7), ついで MeOH-5% 酢酸 (4:6) で溶出した。MeOH-5% 酢酸 (4:6) 溶出部を纏め, TOYOPEARL HW-40F カラムクロマトグラフィー (MeOH-水=3:7→9:1), Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (MeOH-水=8:2) にて分離し, 淡黄色粉末として TCAA を 11.6 mg を得た。

6. TCAA 淡黄色粉末, $[\alpha]_D^{+31}$ (c=0.2, MeOH), High Resolution FAB-MS (negative) m/z: 695.1200 (M⁺-H) for C₃₃H₂₈O₁₇, UV λ_{max} (EtOH)

nm (log ϵ): 244 (4.28), 328 (4.50), ¹H-NMR (CD₃OD) δ : 4.84 (1H, dd, J=9.0, 2.0 Hz), 5.28 (1H, d, J=2.0 Hz), 5.65 (1H, dd, J=9.0, 2.0 Hz), 5.66 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.22 (1H, d, J=15.9 Hz), 6.366 (1H, d, J=15.9 Hz), 6.371 (1H, d, J=15.9 Hz), 6.74 (1H, d, J=8.3 Hz), 6.77 (1H, d, J=8.0 Hz), 6.78 (1H, d, J=8.3 Hz), 6.91 (1H, dd, J=8.3, 1.9 Hz), 6.970 (1H, dd, J=8.3, 1.8 Hz), 6.974 (1H, dd, J=8.3, 1.8 Hz), 7.02 (1H, d, J=1.9 Hz), 7.08 (1H, d, J=1.9 Hz), 7.09 (1H, d, J=1.9 Hz), 7.53 (1H, d, J=15.9 Hz), 7.64 (1H, d, J=15.8 Hz), 7.66 (1H, d, J=16.1 Hz), ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 69.9, 72.7 (2C), 73.1, 113.9, 114.1, 114.2, 115.3 (3C), 116.5 (3C), 123.4 (2C), 123.5, 127.6, 127.7, 127.8, 146.8 (2C), 146.9, 148.2, 148.40, 148.43, 149.8, 149.9 (2C), 167.4, 168.1, 168.4, 170.4, 171.6.

7. ヤーコン地上部エキス中の TCAA の定量
カラム: YMC ODS-A 120-S5 (4.6 mm ϕ ×150 mm), 移動相: 0.1% リン酸/THF 混液 (7:3), カラム温度: 40°C, 流量: 1.0 ml/min., 検出波長: 332 nm.

エキス約 0.1 g を精密に量り, 移動相に溶解し正確に 50 ml とし試料溶液とした。別途, 上記方法で分離・精製した TCAA 標準品約 0.01 g を精密に量り, THF に溶解し正確に 50 ml とした。この液 2 ml に 0.1% リン酸 15 ml を加え混和した後, 移動相を加えて正確に 50 ml とし標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過し, 20 μ l ずつを HPLC に注入し, 各液の TCAA のピーク面積 A_T 及び A_S を測定し, 以下の式によりエキス 1 g 中の TCAA 量を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{エキス 1 g 中の TCAA 量 (mg)} \\ & = \text{標準品採取量 (mg)} \times f \times (1/25) \times (A_T/A_S) \\ & \quad \times (1 \text{ g/エキス採取量 g}) \\ & \quad f: \text{標準品純度 (\%)/100} \end{aligned}$$

結 果

ヤーコン地上部エキスを DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーに付して得られた水, 50% MeOH/水, MeOH 各溶出画分の抗酸化活性を調べたところ, Table 1 に示すように 50% MeOH 溶出部に活性は収斂した。この画分を UV/フォトダイオードアレー検出器を接続した HPLC で多波長分

Table 1. Antioxidant Activities of Fractions and Phenols from Yacon Extract

| Sample | Inhibitory activities on lipid peroxidation | DPPH radical scavenging activities |
|-------------------------|--|---------------------------------------|
| | IC ₅₀ : $\mu\text{g/ml}$ | EC ₅₀ : $\mu\text{g/ml}$ |
| Yacon hot water extract | 6.65 | 15.38 |
| HP20-water | 20.96 | 32.19 |
| HP20-50%MeOH | 1.9 | 2.78 |
| HP20-MeOH | 24.24 | 13.12 |
| 3,4-DCQA | 1.48 (2.87) | 0.91 (1.76) |
| 3,5-DCQA | 2.18 (4.23) | 0.87 (1.69) |
| 4,5-DCQA | 3.38 (6.55) | 0.89 (1.72) |
| TCAA | 0.49 (0.70) | 0.69 (0.99) |
| Isoquercitrin | 6.64 (14.31) | 1.53 (3.30) |
| Chlorogenic acid | 13.21 (37.32) | 1.13 (3.19) |
| (\pm)-Catechin | 13.69 (47.16) | 1.56 (5.37) |
| α -Tocopherol | 71.24(165.67) | 5.65(13.14) |
| Caffeic acid | 9.97 (55.34) | 4.39(24.32) |
| Enzogenol | 2.17 | 1.94 |
| Ellagic acid | 0.56 (1.85) | 0.51 (1.69) |

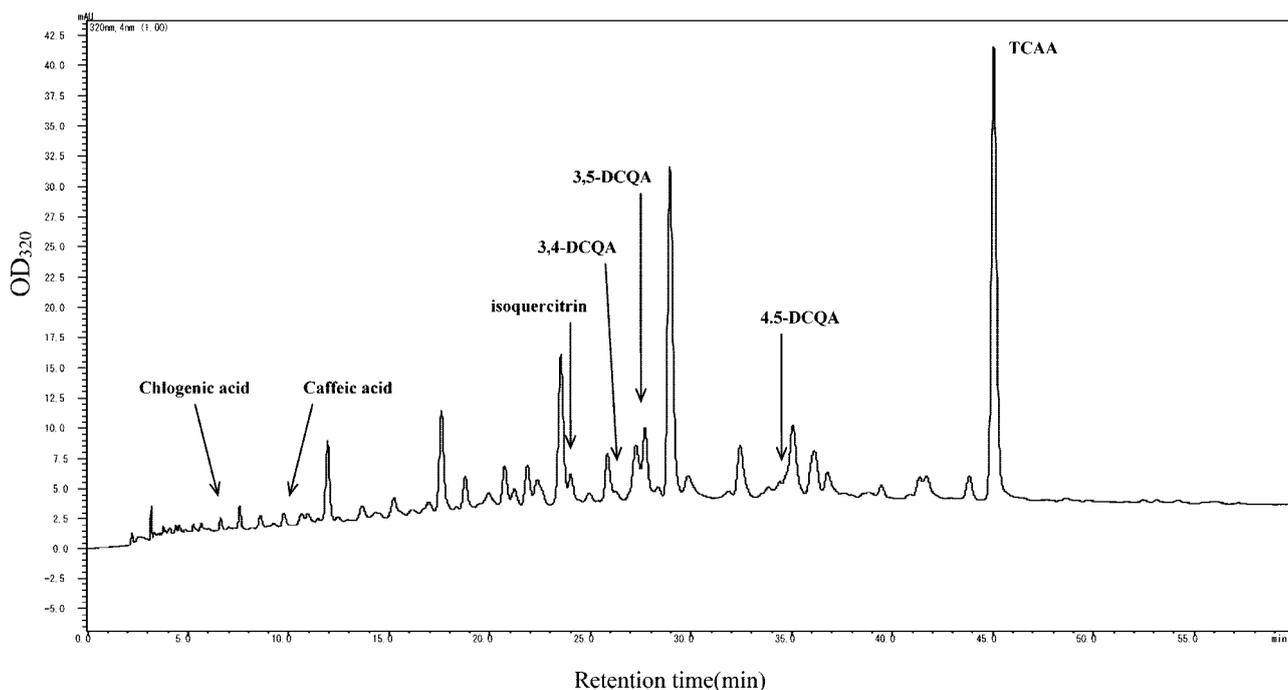
() : μM 

Fig. 1. HPLC Chromatogram of DIAION HP-20 50%MeOH Fraction from Yacon Extract

HPLC conditions; Column: YMC-Pack R-ODS-5-A (4.6 mm ϕ ×250 mm), Mobile phase: A=acetonitrile, B=5% acetic acid in water, Gradient: 10–25% A in 60 minutes, Flow rate: 1.0 ml/min., Detector: UV/photodiode array (at 320 nm).

析したところ、290 nm 及び 330 nm 付近に極大吸収を有する成分が多数存在し、50%MeOH 溶出部は caffeoyl 基を有する成分からなると推定された。この画分には、3,4-DCQA、3,5-DCQA、4,5-DCQA、isoquercitrin など前報¹⁾で報告した α -グルコシダー

ゼ阻害活性成分が確認されたほか、これまで未確認の高含量成分が検出された (Fig. 1) ことからカラムクロマトグラフィーにて分離・精製し、¹H 及び ¹³C-NMR データの文献値¹²⁾との比較から、ヤーコン塊根部から抗酸化活性物質としての分離の報告¹³⁾

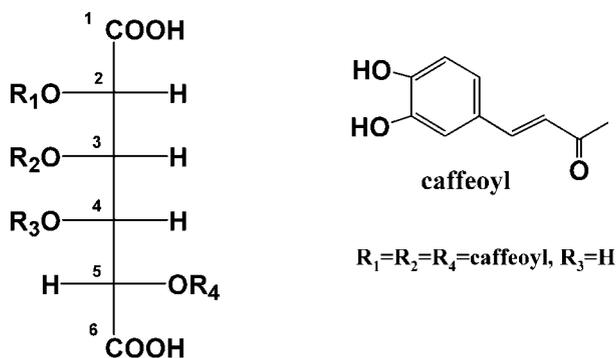


Fig. 2. Structure of TCAA

がある TCAA (Fig. 2) と同定した。

単離した TCAA と DCQA 類の抗酸化活性を、天然物由来の抗酸化活性成分とともに過酸化脂質生成抑制及び DPPH ラジカル捕捉試験により評価した。その結果、過酸化脂質生成抑制作用は、TCAA が最も強くモル濃度比較で (±)-catechin の 68 倍、ellagic acid の 2.5 倍の活性を示した。また、TCAA, DCQA 類の DPPH ラジカル捕捉作用は、chlorogenic acid,⁹⁾ ellagic acid,¹⁰⁾ enzogenol¹¹⁾ と同等で、 α -tocopherol よりは強いものであった (Table 1)。

一方、 α -グルコシダーゼ阻害活性では、スクラーゼ及びアミラーゼに対する阻害活性は弱かったが (それぞれ $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50} = 420 \mu\text{g/ml}$)、マルターゼに対しては強い阻害活性を示し ($IC_{50} = 49 \mu\text{g/ml}$)、対照とした acarbose に比べ 19 分の 1 の活性であった。

ヤーコン地上部エキス中の TCAA を定量した結果、含量は 0.25% であり、ヤーコン地上部エキスの α -グルコシダーゼ阻害活性 ($IC_{50} = 5.8 \text{ mg/ml}$) に対する寄与率は 30% と算出された。

考 察

今回ヤーコン地上部より分離した強力な抗酸化活性と α -グルコシダーゼ阻害活性を有する TCAA は、同じヤーコンの塊根部より既に単離・報告¹²⁾されているものであるが、 α -グルコシダーゼ阻害活性が認められたのは今回が最初である。

前報¹⁾でわれわれは、ヤーコンの α -グルコシダーゼ阻害活性成分は主として DCQA 類に拠るとしていたが、今回、強い活性を有し、エキス中含量の高い TCAA が得られた。TCAA の Sephadex

LH-20 カラムクロマトグラフィーにおいて、塩になったものは MeOH 濃度の低いところで溶出され、遊離のものは吸着されて溶出が遅くなり、前報では TCAA の明確な阻害活性のピークが検出されなかったものと推定される。

DCQA 類は春菊,⁵⁾ ヨモギ¹⁴⁾ など多くのキク科植物やコーヒー豆¹⁵⁾ に含まれていることが知られており、ヤーコン特有の α -グルコシダーゼ阻害活性成分とは言えないが、TCAA はこれまでにヤーコン以外の植物より分離された報告はなく、エキス中に占める含量も高いことからヤーコンエキスの α -グルコシダーゼ阻害活性に関与する主成分と考えられる。

また、TCAA は (±)-catechin よりも強い過酸化脂質生成抑制効果を示し、 α -tocopherol と同等のラジカル捕捉効果を示した。

食後高血糖状態の繰り返しは膵 β 細胞を傷害し、膵 β 細胞容積の低下を伴うインスリン分泌の障害を導き、II 型糖尿病の耐糖能をさらに悪化させ、空腹時高血糖を示すような糖尿病へと移行すると言われている。^{2,3)} また、膵臓 β 細胞の疲弊を抗酸化物質が抑制することは多くの報告¹⁶⁻¹⁸⁾ があり、体内動態検討は今後の課題であるが、TCAA にも同様の効果が期待される。

以上のように、ヤーコン地上部は抗酸化活性とマルターゼ選択的な α -グルコシダーゼ阻害活性を併せ持つ成分を多量に含んでおり、糖尿病発症予防に有用な素材と考えられる。

REFERENCES

- 1) Terada S., Ito K., Taka M., Ogose N., Noguchi N., Koide Y., *Nat. Med.*, **57**, 89-94 (2003).
- 2) Tanaka Y., Gleason C. E., Tran P. O. T., Harmon J. S., Robertson R. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 10857-10862 (1999).
- 3) Katoh M., Sakurai K., Fujimoto Y., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 831-839 (2002).
- 4) Moharram F. A., Marzouk M. S., EI-Toumy S. A., Ahmed A. A., Aboutabl E. A., *Phytother. Res.*, **17**, 767-773 (2003).
- 5) Chuda Y., Ono H., Ohnishi-Kameyama M., Nagata T., Tsushida T., *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2037-2039 (1996).

- 6) Ohnishi M., Morishita H., Toda S., Yase Y., Kido R., *Phytochemistry*, **47**, 1215–1218 (1998).
- 7) Ohkawa H., Ohnishi N., Yagi K., *Anal. Biochem.*, **95**, 351–358 (1979).
- 8) Blois M. S., *Nature*, **181**, 1199–1200 (1958).
- 9) Kweon M. H., Hwang H. J., Sung H. C., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4646–4655 (2001).
- 10) Solon S., Lopes L., Teixeira deSousa Jr. P., Schmeda-Hirschmann G., *J. Ethnopharmacol.*, **72**, 173–178 (2000).
- 11) Kahkonen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J. P., Pihlaja K., Kujala T. S., Heinonen M., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954–3962 (1999).
- 12) Takenaka M., Yan X., Ono H., Yoshida M., Nagata T., Nakanishi T., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 793–796 (2003).
- 13) Takenaka M., Ono H., Nagata T., Kameyama M., Yan X., *Kokai Tokkyo Koho.*, JP 2001–19664 (2001).
- 14) Okuda T., Hatano T., Agata I., Nishibe S., Kimura K., *Yakugaku Zasshi*, **106**, 894–899 (1986).
- 15) Clifford M. N., Kellard B., *Food Chem.*, **34**, 81–88 (1989).
- 16) Adeghate E., Parvez S. H., *Toxicology*, **153**, 143–156 (2000).
- 17) Uchiyama K., Naito Y., Hasegawa G., Nakamura N., Takahashi J., Yoshikawa T., *Redox Rep.*, **7**, 290–293 (2002).
- 18) Lapidot T., Walker M. D., Kanner J., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7220–7225 (2002).