

ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.) に含まれる アントシアニン色素

春日 敦子*¹ 大内 和美*² 青柳 康夫*²

Anthocyanin pigment in *Houttuynia cordata* Thunb.

Atsuko KASUGA*¹, Kazumi OOUCHI*², Yasuo AOYAGI*²

Abstract

We previously screened the ethanol extracts of edible plants and wild mushrooms for antioxidant properties; therein, we observed strong antioxidant properties in dokudami (*Houttuynia cordata* Thunb.) and others. As we studied the antioxidant component of dokudami, we discovered a red pigment that we predicted would also contribute to the antioxidant properties of dokudami; in this study, we aimed to isolate and identify that pigment.

To begin, a 540g sample of lyophilized dokudami powder was extracted with 50L of 70% ethanol by heating under reflux; the crude extract was concentrated and then fractionated into diethyl ether, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water-soluble fractions. The water-soluble fraction was purified using various column chromatography methods to obtain 12mg of red crystals. We then sought to determine the structure of the newly isolated crystals. After subjection to various instrumental analyses, the crystals were identified as the anthocyanin keracyanin.

The keracyanin content in fresh dokudami was 26.4mg/100g; no keracyanin was detected in dried dokudami. The DPPH radical-scavenging activity of keracyanin chloride was approximately 1/10 that of quercetin; moreover, the keracyanin content was low. Therefore, we postulate that its antioxidant contribution to dokudami is low.

Key words: ドクダミ, アントシアニン, ケラシアニン, 抗酸化効果

緒 言

ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb.) はドクダミ科ドクダミ属の多年草の植物であり、日本では道ばたや日陰の住宅周辺など何処にでも見かける植物である。強烈な独特の香気を有し、積極的に料理に利用されることは少ないが、乾燥してドクダミ茶として昔から飲用されており、健康食品として乾燥ドクダミが現在も販売されている。ドクダミは生薬ではジュウヤク (十葉, 重葉) と言われ、煎じて緩下, 利尿薬として用いる。また中国の医薬学では魚腥草 (ギョセイソウ) と言い、薬理は抗菌作用, 抗ウイルス作用, 利尿作用, 鎮痛, 止血作用などが報告¹⁾ されている。最近では単純ヘルペスウイルス, インフルエンザウイルス, ヒト免疫不全ウイルスなどのウイルス破壊性²⁾, 抗ウイルス活性³⁾, 肥満細胞の関与するアナフィラキシー反応の抑制効果⁴⁾, 抗白血病活性⁵⁾, 抗腫瘍活性⁶⁾, 精油成分の抗菌性⁷⁾, 水抽出液のサルモネラ菌に対する抗菌性⁸⁾, 抗炎症活性^{9, 10)}, 抗変異原性¹¹⁾ など

様々な機能が報告されている。

ドクダミ抽出物は、2011年の既存添加物の改正 (平成23年厚生労働省告示第157号) によって既存添加物名簿から実用報告例がなく削除されたが、これ以前には「イソケルシトリンを主成分」とするドクダミ抽出液のフラボノイド化合物が、酸化防止効果を持つ添加物として使用が認められていた。その抽出物製法は「ドクダミの葉より、エタノールで抽出し精製する」とも記載されていた。ドクダミのフラボノイド配糖体に関する研究^{12, 13)} では、ドクダミの葉にはケルシトリン, 花穂にはヒペリンとケルシトリンが多く含有され、それ以外にルチン, イソケルシトリン, アフゼリンが含有される。またこれらのフラボノイド配糖体の含量は、ドクダミ栽培地の光条件で遮光率が高いと減少傾向にあることも報告¹⁴⁾ されている。

著者らは、山菜や野草など食用植物や野生キノコのエタノール抽出液の抗酸化性についてスクリーニングを行い、ドクダミなどに強い抗酸化性が認められたことを報

*¹ 女子栄養大学短期大学部 : Junior College of Kagawa Nutrition University

*² 女子栄養大学 : Kagawa Nutrition University

告¹⁵⁾してきた。ドクダミの抗酸化成分は従来から報告されているケルセチン類などと判明しているが、ドクダミの抗酸化成分を検討している過程で、赤色を呈する画分が認められ、この画分も抗酸化効果を呈することが認められた。そのため、この色素成分もドクダミの抗酸化性に何らかの寄与をしているのではないかと予想され、この色素成分がどのような成分であるかを明らかにすることとした。ドクダミの抗酸化成分の報告^{16, 17)}は見られるが、ドクダミの赤色色素についての報告は調べる限り見当たらない。そこでこの赤色色素成分を単離、同定することを試みたのでその結果を報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

実験に用いた試料は、初夏に東京都豊島区内の本学構内に自生したものであり、地上部分（葉及び茎、高さ10～40cm程度）を約7kg採取した。ドクダミは採取後洗浄し、一部は生葉のまま、残り大部分は冷凍保存後に凍結乾燥し粉碎して、実験に供するまで-40℃のフリーザーにて保存した。

一方、市販の乾燥ドクダミは、ドクダミ茶として日本国内で販売されている葉及び茎が乾燥されたものであり、中国産、佐賀県産のものを東京都区内の百貨店、およびドラッグストアにて購入した。

実験に用いたcyanidin chloride, pelargonidin chloride, keracyanin chlorideはSigma-Aldrich Corp.製の analytical standardであり、それ以外の試薬は全て富士フィルムと光純薬株式会社製の特級品を用いた。

2. 試料の抽出と分画

Fig. 1にドクダミの粉末凍結乾燥品の抽出、分画の概要を示した。即ち凍結乾燥ドクダミ約540g（生鮮物として約7kg）を、7回に分け、70%エタノール約50Lを用いて90℃で加熱還流抽出した。抽出液を冷却後ろ過し、残渣に再び70%エタノールを加え、同様に抽出、ろ過を合計で3回繰り返した。ろ液を合わせ、ロータリーエバポレータを用いて35℃で1L程度まで濃縮し、ジエチルエーテル2Lを用いて脱脂した。脱脂した水層をクロロホルム、酢酸エチル、ブタノールそれぞれ2Lずつを用いて順に抽出し、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール、水抽出画分に分画した。

水抽出画分を複数回に分け、アンバーライトXAD 7HPを充填したカラム（ID 26φ×1000mm）に、溶離液として水1Lおよび5%酢酸メタノール溶液1.2Lを用い、繰り返しカラムクロマトグラフィーを行った。5%酢酸メタノール溶出画分に目視で赤色が認められたので、この画分を50mL程度まで濃縮した。濃縮液に3倍量のジエチルエーテルを加え、生じた沈殿をろ過し、暗赤色の粗結晶約10gを得た。次いでこの暗赤色の粗結晶を水で溶解し、複数回に分け、C18（細孔径75Å、粒子径

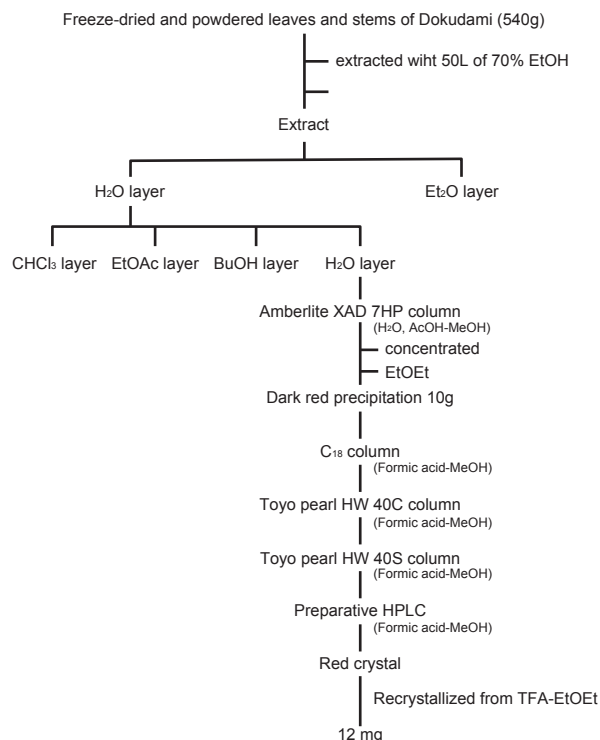


Fig. 1. The Scheme of Isolated Red Pigment from Dokudami (*Houttuynia cordata* Thunb.)

30～50μm) ついでトヨパールHW40CおよびトヨパールHW40Sを充填したカラム（いずれもID 26φ×1,000mm）を用い、溶離液に0.2%ギ酸を含む20%～100%メタノール溶液をグラジエントで溶出した。目視で赤色の濃いフラクションを集め濃縮後、分取HPLCによりさらに精製を行った。分取HPLCの条件は以下の通りである。カラム：Inertsil ODS-4（20mmφ×150mm）、ガードカラム：同（20mmφ×50mm）、流量：9 mL/min.、カラム温度：室温、溶離液：A 0.2%ギ酸 Bメタノール、グラジエント：0分A:B=65:35→16分A:B=50:50、検出器：PDA Multiwavelength Detector MD-2010（日本分光株式会社）200-650nm、ポンプ：PU-2080（日本分光株式会社）。分取HPLCで得られたフラクションを濃縮し、赤色沈殿を得た。

赤色沈殿を少量のトリフルオロ酢酸で溶解し、過剰のジエチルエーテルを加え再結晶した。これをろ過して結晶を取り、減圧乾燥した。

3. 得られた赤色結晶の加水分解及び糖、有機酸、アグリコンの分析

加水分解：分取HPLCにより得られた赤色結晶の一部を、立澤ら¹⁸⁾の方法に従い5%酢酸を含む50%メタノール溶液1mLに溶解させ、2Mの塩酸を1mL加え、沸騰水浴上で2時間加熱還流し、加水分解を行った。冷却後、ジエチルエーテルを加え、エーテル層と水層に分画し、水層はイソアミルアルコールを加え、イソアミルアルコール層と水層に分画した。

糖分析：加水分解によって得られた水層について、糖

の検出を蛍光検出器を用いたポストカラム法で行った。HPLCの条件は以下の通りである。カラム：Shodex Asahipak NH₂P-50 4E (4.6 mm φ×250 mm) (SHOKO. CO., LTD.), ガードカラム：同 (4.6 mm φ×50 mm) (SHOKO. CO., LTD.), カラム温度：室温, 流量：1.0 mL/min., 反応液：50 mM 塩酸グアニジン・1.5 mM 過ヨウ素酸ナトリウム・0.1 M ホウ酸水溶液 (pH10.5), 反応液流量：0.3 mL/min, 反応相：150 °C Reaction Oven RO-2061 (日本分光株式会社), 移動層：アセトニトリル：水 = 3 : 1, 波長：励起波長325 nm, 蛍光波長420 nm F1000 Fluorescence Spectra Photometer (株式会社日立製作所), ポンプ：PU-2080 (日本分光株式会社)。

有機酸分析：加水分解で得られたジエチルエーテル層について、有機酸の検出をHPLCで行った。HPLCの条件は以下の通りである。カラム：COSMOSIL 5C18-MS (4.6 mm φ×250 mm) (Nacalai tesque, INC.), 流量：1.0 mL/min., カラム温度：40 °C, 溶離液：アセトニトリル：50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH4.0) = 1 : 9, 検出：254 nm UV-970 (日本分光株式会社), ポンプ：PU-2080 (日本分光株式会社)。

アグリコンの分析：加水分解で得られたイソアミルアルコール層について、アグリコンの検出をHPLCで行った。HPLCの条件は以下の通りである。カラム：Inertsil ODS-4 (4.6 mm φ×150 mm) (GL Sciences Inc.), 流量：1.0 mL/min., カラム温度：室温, 溶離液：0.1% 酢酸 20% アセトニトリル水溶液, 検出：PDA Multiwavelength Detector MD-2010 (日本分光株式会社), ポンプ：PU-2080 (日本分光株式会社)。

4. 機器分析

LC-MS：LC-MS分析は、HPLC (Waters; alliance2695), MS (Waters; LCT Premier (TOF-MS)), カラム：TSKgel ODS-100V (2 mm φ×150 mm, 東ソー株式会社), 溶離液：A : 0.1% 酢酸水溶液 B : 0.1% 酢酸アセトニトリル溶液, 0分 A : B = 94 : 6 → 15分 A : B = 85 : 15 → 20分 A : B = 75 : 25 → 30分 A : B = 94 : 6, 流量：0.2 mL/min, カラム温度：40 °Cで行った。MS条件は以下の通りである。Capillary Voltages: 2000 V, Desolvation Temperature: 300 °C, Gas Flow 350 L/hr, Mode: Positive Ion W Optics, Scanning Mass: m/z100-1000, Amu: 3 s/scan

NMR：¹H NMR, ¹³C NMR スペクトルは、溶媒にCD₃OD, 内部標準としてTMSを用い、JNM-EX-270 FT-NMR (JEOL) で測定した。

5. DPPHラジカル捕捉活性の測定

DPPHラジカル捕捉活性は、ジエチルエーテル、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール、水抽出画分は北尾ら¹⁹⁾の試験管を用いた評価法を用いて測定した。即ちそれぞれの溶媒抽出画分は2%溶液0.2 mLまたはブランクとしてそれぞれの抽出画分の溶媒0.2 mL, または500 μMのTrolox 0.2 mLを小試験管に入れ、100 mMト

リス塩酸緩衝液を0.8 mL, 500 μMのDPPHエタノール溶液を1.0 mL加え、直ちにミキサーで攪拌し、室温、暗所にて30分間反応させ、反応液の吸光度を517 nmで測定した。ラジカル捕捉活性は抽出物全量および抽出物1 g当たりのTrolox相当量として算出した。

分取HPLCによる分画の測定では、96穴プレートを用いた評価法²⁰⁾を用いて、HPLC溶出液フラクション全量および100 μL当たりのTrolox相当量として算出した。

6. 生鮮ドクダミ、市販乾燥ドクダミ中のkeracyanin含有量の測定

-40 °Cで冷凍保存したドクダミ生葉200 g, および2種類の市販乾燥ドクダミ50 gをそれぞれ5%トリフルオロ酢酸-メタノール溶液300 mLを用いて、ポリトロンでホモジナイズしろ過後、ろ液を得た。残渣に再び溶媒を加え同様にホモジナイズ、ろ過を全部で3回繰り返し、ろ液を合わせ、少量まで濃縮した。濃縮液にクロロホルムと水を加え、クロロホルム層と水層に分画した。水層にメタノールを加え、定容後、ろ過しHPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りである。Inertsil ODS-4 (4.6 mm φ×150 mm), 流量：0.5 mL/min., カラム温度：室温, 溶離液：A 0.2% 酢酸 Bメタノール, グラジエント：0分 A : B = 65 : 35 → 16分 A : B = 50 : 50, 検出器：PDA Multiwavelength Detector MD-2010 (日本分光株式会社), ポンプ：PU-2080 (日本分光株式会社)。定量は、keracyanin chlorideを標準物質としてピーク面積の比較により行った。

実験結果および考察

1. 凍結乾燥ドクダミから赤色色素の単離

凍結乾燥ドクダミ約540 g (生鮮物として約7 kg) を70%エタノールで抽出し濃縮後、ジエチルエーテルで脱脂後、順次クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール、水抽出画分に分画した。その結果、ジエチルエーテル画分4.4 g, クロロホルム画分55.6 g, 酢酸エチル画分7.7 g, ブタノール画分9.8 g, 水画分93.6 gを得た。それぞれの抽出物を2 w/v%になるように抽出溶媒で溶解し、これらを適宜希釈し、ジエチルエーテル、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール、水画分のDPPHラジカル捕捉効果を測定した。Table 1にその結果を示した。上段はそれぞれの画分の抽出物1 gあたりのμmol Trolox相当量を、下段は上段の値にそれぞれの画分の抽出物重量を乗じたμmol Trolox相当量を示した。抽出物1 gあたりのDPPHラジカル捕捉効果は、従来から報告^{12, 13)}されているケルセチンなどのフラボノイド化合物が存在する酢酸エチル画分、ブタノール画分が最も高く、次に水画分であった。しかし抽出物は水画分が最も多く、抽出物重量を乗じた下段の値のラジカル捕捉活性では、水画分が最も高かった。この水画分は赤色を呈しており、この色素成分の他にも極性の高いフラボノイドやポリフェノールなど種々の抗酸化成分が存在していると考えられ、一つ一つ

Table 1. DPPH radical scavenging activity of each fractions

Fraction	Et ₂ O	CHCl ₃	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O
Antioxidant capacity (μ mol Trolox eq./concentrated extracts 1g)	1,839	518	3,200	3,253	3,073
Antioxidant capacity (μ mol Trolox eq./all concentrated extracts)	8,092	24,640	24,640	31,879	287,600

Data expressed as mean (n=3)

Lyophilized Dokudami powder(540g) was extracted with 70% ethanol by heating at reflux, fractionated into diethylether, chloroform, ethyl acetate, butanol and water in order. Each fractions were concentrated to obtain 4.4g, 55.6g, 7.7g, 9.8g and 93.6g respectively. DPPH radical scavenging activity was measured. The upper row of table 1 showed antioxidant capacity as a 1g of concentrated extracts and the lower row of table 1 showed antioxidant capacity as multiply the weight(g) of the concentrate by the value in the upper row.

Table 2. DPPH radical scavenging activity of each fraction of preparative HPLC

Peak	①	②	③	④	⑤
Antioxidant capacity (nmol Trolox eq./100 μ L)	27.6	5.4	1.5	3.2	1.1
Antioxidant capacity (nmol Trolox eq./ μ L of whole quantity)	197,616	40,754	2,148	8,915	6,087

Data expressed as mean (n=3). ①~⑤ correspond to the Fig. 2.

DPPH radical scavenging activity of 5 fractions, which were eluted using preparative HPLC, were measured. Only the fraction of ① showed a red color. The upper row of table 2 showed antioxidant capacity as 100 μ L, and the lower row as μ L of whole quantity of each fractions.

の抗酸化効果は弱くとも、これらの成分の相乗効果が画面分の高いラジカル捕捉活性に起因したと思われる。赤色素成分もドクダミの抗酸化効果の一因を担っていると予想され、ドクダミの色素成分の抗酸化性に関する報告が見当たらないことから、この赤色素を単離することにした。

水抽出画分を、溶解液に水および5%酢酸メタノール溶液を用い、アンバーライトXAD 7HPカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、溶出した赤色着色フラクションを濃縮した。カラムクロマトグラフィーによる精製は溶出液の赤色を目視および280nmの紫外吸収を確認しながら行った。この濃縮液にジエチルエーテルを加え、暗赤色の沈殿約10gを得た。この沈殿を溶解液に0.2%酢酸を含む10%~100%メタノール溶液を用いて、C₁₈カラムクロマトグラフィー、トヨパールHW40Cカラムクロマトグラフィー、トヨパールHW40Sカラムクロマトグラフィーを繰り返し行った。赤色着色フラクションを濃縮乾固し、さらに分取HPLCにより繰り返し精製を行った。分取HPLCでは目視以外にPDA検出器を用いて検出した。色素成分がベタシアニンやキノンの可能性も予想されたため、Florianら²¹⁾がピタヤ(ドラゴンフルーツ)からベタシアニンを単離同定している方法を参考に、分取HPLCではベタキサントニンの475nm、ベタシアニンの538nm、ヒドロキシ桂皮酸の320nmも同時にモニタリングした。分取HPLCによるクロマトグラムをFig. 2に示した。Fig. 2に示したように溶出液をクロマトグラムより5つのピーク①~⑤に分取した。赤色はフラクション①のピークに認められ、それ以外のフラクション②~⑤は無色であった。またフラクション①は320nmでの吸収は小さく、475nm, 538nmに吸収が認められた。しかしフラクション②~⑤は320nmにのみ

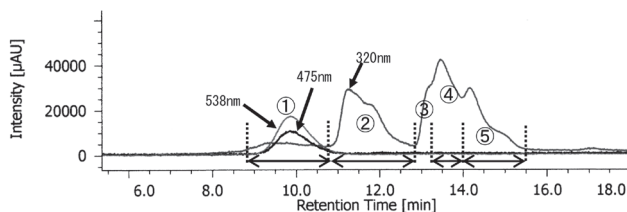


Fig. 2. Chromatogram of Preparative HPLC

Further purification was performed using preparative HPLC with three wavelengths (320,475,538nm). Only the fraction of ① showed a red color.

吸収が認められていた。

分取カラムにより分離した①~⑤のフラクションの溶出液のラジカル捕捉活性を測定した。Table 2にその結果を示したが、溶出液中の溶解物重量が極く少量で単位重量当たりのラジカル捕捉活性を測定することができなかったため、上段は溶出液100 μ L当たりのnmol Trolox相当量を、下段は繰り返し行った分取カラムの溶出液を①~⑤のフラクションごとに合わせた全量のnmol Trolox相当量として示した。Table 2に示すように、活性は①の赤色ピークに最も認められ、②~⑤の画分は全量当たりでもラジカル捕捉活性は①画分に比較してかなり低かった。①画分を集め濃縮乾固し、少量のトリフルオロ酢酸で溶解し、過剰のジエチルエーテルを加えて生成した沈殿物をろ過し、減圧乾燥することにより12mgの赤色結晶を得た。この結晶はHPLCにより単一のピークであることを確認した。

2. 得られた赤色素の構造決定

今回得られた赤色素は、アントシアニン、ベタシアニン、キノン等が予想された。植物ではアントシアニンとベタシアニンの分布は排他的であり、両者が共存する例はないことが報告²²⁾されている。またベタレインを

持つ植物群は、ナデシコ目と一部の担子菌門に限られ、作田²³⁾はナデシコ目がアントシアニンを合成しない理由を考察していることから、ベタシアニンではないと考えられた。一方、タデ科コショウ目のドクダミと同じタデ科のツルドクダミ (*Polygonum multiflorum* Thunb.) に、茎にアントラキノン類のエモジン、クリソファノールなどの存在が報告²⁴⁾されており、同じタデ科のギシギシ (*Rumex japonicus*) には黄色のルメジャポシドA~Eが報告²⁵⁾されている。これらの報告から320nmでは吸収が小さかったものの、キノンの可能性も考えられた。

分取HPLCにより得られた①画分について、以下の定性試験を行った。①画分の水溶液に希塩酸を添加したところ、赤色のままで変化が認められなかったが、希アルカリでは青色に変化した。また2%塩化第二鉄水溶液を一滴加えると、紫色となり後に褐色に変化、5%中性酢酸鉛水溶液を数滴加えると青色となった。これらの結果からアントシアニンが有力と予想された。

次に精製した赤色結晶をLC-TOF-MSにより元素の組成推定を行った。正イオンは、通常は分子量M+1で検出されることが多いが、アントシアニンは正の電荷を持っているので分子量がそのまま検出される。赤色結晶はアントシアニンと予想されたので、m/zを[M]⁺として示した。組成推定から赤色結晶はC₂₇H₃₁O₁₅、実測値；m/z 595.1663[M]⁺、keracyanin理論値；m/z 595.1657[M]⁺であった。Nが存在しないことからベタシアニンではないことはここでも裏付けられた。また吸収極大は516nmであった。

構造決定のために、精製赤色結晶を加水分解後、エーテル層、イソamilアルコール層、水層に分画し、糖、酸、アグリコンの分析を行った。糖についてアラビノース、グルコース、マンノース、ラムノース、キシロースを標準品として分析した結果、グルコースとラムノースがモル比で1.3:1で検出された。しかし他の糖は検出されなかった。酸についてはマロン酸、カフェ酸、クマル酸、フェルラ酸を標準品として分析したが、これらの有機酸は検出されなかった。赤色結晶のLC-TOF-MSの組成推定から炭素が27個、酸素が15個であり、グルコースとラムノースが結合していることから、アントシアニン骨格のB環にはメトキシ基を持たず、ヒドロキシ基も2個以下のペラルゴニジンまたはシアニジンが予想された。そこでこれらの塩化物を標準品としてHPLC溶出時間の比較を行ったところ、シアニジクロライドと保持時間が一致し、PDA検出器の吸光度スペクトルもほぼ一致していた。

LC-MSで得られた質量スペクトルのライブラリー検索結果および上記の実験結果から、赤色色素の候補化合物keracyanin (cyanidin 3-rutinoside) が推定され、¹H NMR、¹³C NMRスペクトル分析を行ったところ、keracyanin標準品と赤色色素は一致していた。以上の結果からドクダミから単離した色素はアントシアニンのkeracyanin (cyanidin-3-D-rutinoside) と同定した。Fig. 3にkeracyanin

の構造を示した。

KeracyaninはTatsuzawaらにより、cymbidium (暗紫色系品種“Eicho”)²⁶⁾、alestroemeria “Westkabd”²⁷⁾、tulips²⁸⁾などの花や、balaton tart cherry²⁹⁾の果実などから単離同定されているアントシアニン色素である。また、ソバスプラウトに含まれる主要アントシアニンもkeracyaninであるという報告³⁰⁾もある。このようにkeracyaninは既知化合物で、抗酸化効果も報告されていたが、ドクダミに含まれるkeracyaninは、ペーパーや薄層クロマトグラフィ法による定性試験³¹⁾以外では初めての報告である。

3. 生鮮ドクダミ、市販乾燥ドクダミ中のkeracyanin含有量とその抗酸化効果

生鮮ドクダミ及び市販の乾燥ドクダミ中のkeracyanin含有量を分析した。生鮮ドクダミは採取後に目視で茎や葉の裏が赤いものと、赤くないものに分け、それぞれの含有量を測定した。その結果、生鮮物100g当たり赤い茎葉は38.3mg/100gと、赤くない茎葉は10.2mg/100gであり、ドクダミ茎葉全体としては26.4mg/100gであった。しかし、市販の乾燥ドクダミにkeracyaninは全く認められなかった。乾燥ドクダミでkeracyaninが認められなかった理由は、ドクダミの乾燥が乾燥機による高温乾燥や天日干しにより、keracyaninが分解されたと考えられる。

keracyaninはサクランボの主たるアントシアニンであり、red sweet品種10種ではその含有量は、生鮮重量100g当たり34~185mgと報告³²⁾されている。またソバスプラウト³⁰⁾ではkeracyanin含有量は乾物100g当たり茎は45~66mg、子葉は1~15mgであり、抗酸化性への寄与はルチン、イソオリエンチン、オリエンチンが大きく、keracyaninは小さいことが報告されている。

ドクダミの抗酸化効果に関しては、Choら¹⁶⁾はドクダ

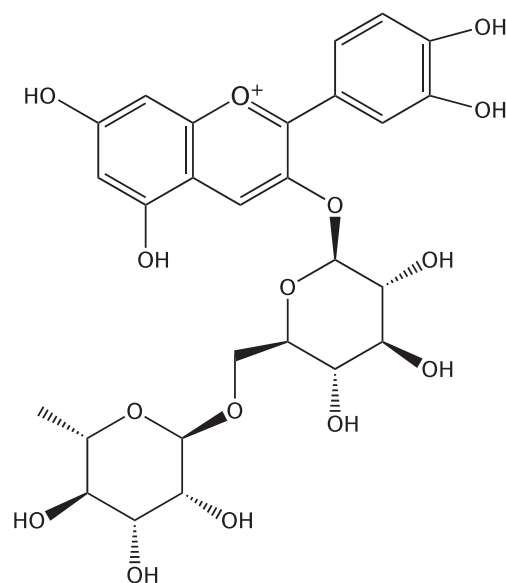


Fig. 3. The Structure of Keracyanin

ミのメタノール抽出液からケルセチンやそのガラクトース、ラムノース配糖体、カンフェロールのラムノース配糖体を単離同定し、それらのDPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル捕捉活性を測定している。

一方 Chou ら¹⁷⁾ もドクダミから2つの新規化合物 houttuynoside A, houttuynamide A と38の化合物を単離し様々の生理活性を測定し、ケルセチンとそのガラクトース配糖体に強いDPPHラジカル捕捉効果が認められたことを報告している。今回keracyanin chlorideとケルセチン標準品のDPPHラジカル捕捉効果を測定したところ、それぞれ、1,010 μ mol Trolox相当量/g, 9,126 μ mol Trolox相当量/gであった。ドクダミ中のkeracyanin含有量が生鮮物100gあたり数10mgと少ないこと、ラジカル捕捉活性も強くないことからkeracyanin単独のドクダミの抗酸化性への寄与率は小さいと思われる。しかしkeracyaninが存在した水抽出画分は、最も抽出物重量が多く、極性の高いフラボノイドやポリフェノールなど種々の抗酸化成分が存在する。Nuengchamnonng ら³³⁾ はドクダミの水抽出物の抗酸化効果を測定し、キナ酸、コーヒー酸、プロシアニジンB、クロロゲン酸、カテキン等を報告している。またChou ら¹⁷⁾ もドクダミ中のバニリン酸、プロトカテキン酸、4-ヒドロキシ安息香酸、ケルセチン、アフゼリンなどを報告している。ヒドロキシ酸、ヒドロキシ化合物等は抗酸化成分のシネルギストとして働く³⁴⁾ ことは知られており、ドクダミに含まれるこれら成分とkeracyaninが、何がしかの相乗効果をもたらす可能性も示唆される。

要 約

著者らは今までに食用植物や野生キノコのエタノール抽出液の抗酸化性についてスクリーニングを行い、ドクダミなどに強い抗酸化性が認められたことを報告してきた。ドクダミの抗酸化成分を検討している過程で赤色素画分を発見し、この色素成分もドクダミの抗酸化性に何らかの寄与をしているのではないかと予想し、赤色素成分を単離、同定することを試みた。

凍結乾燥粉末ドクダミ540gを70%エタノール50Lを用い加熱還流抽出し、濃縮後ジエチルエーテル、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール、水可溶画分に分画した。水画分を種々のカラムクロマトグラフィーを行い、赤色結晶を12mg得た。この結晶の種々の機器分析を行い、この赤色素はアントシアニンのkeracyaninと同定した。Keracyaninは既知化合物で、抗酸化効果も報告されているが、ドクダミ中に含まれるkeracyaninは初めての報告である。

Keracyaninの生鮮物含有量を測定したところ26.4mg/100gであり、乾燥ドクダミには含有されていなかった。Keracyanin chlorolrideのDPPHラジカル捕捉活性はquercetinの約1/10であり、keracyanin含有量も低いことから、keracyanin単独でのドクダミの抗酸化性への寄与率は小さいと思われる。

文 献

- 1) 上海科学技術出版社・小学館編, 中薬大辞典 第一巻, 507-509, 小学館 (東京) (1998)
- 2) Hayashi, K., Kamiya, M. and Hayashi, T.: Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta Med.*, **61**, 237-241 (1995)
- 3) Ren, W., Sui, X. and Yin, J.: The effect of *Houttuynia cordata* injection on pseudorabies herpesvirus (PrV) infection *in vitro*. *Pharm. Biol.*, **49**, 161-166 (2011)
- 4) Li, G. Z., Chai, O. H., Lee, M. S., Han, E. H., Kim, H. T. and Song, C. H.: Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1864-1868 (2005)
- 5) Chang, J. S., Chiang, L. C., Chen, C. C., Liu, L. T., Wang, K. C. and Lin, C. C.: Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia Cordata* Thunb. *Am. J. Chin. Med.*, **29**, 303-312 (2001)
- 6) Kim, S. K., Ryu, S. Y., No, J., Choi, S. U. and Kim, Y. S.: Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 518-521 (2001)
- 7) Lu, H., Wu, X., Liang, Y. and Zhang, J.: Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia Thunb.* *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 936-940 (2006)
- 8) Kim, G. S., Kim, D. H., Lim, J. J., Lee, J. J., Han, D. Y., Lee, W. M., Jung, W. C., Min, W. G., Won, C. G., Rhee, M. H., Lee, H. J. and Kim, S.: Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen *Salmonella* within the RAW 264.7 macrophage. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2012-2017 (2008)
- 9) Woranam, K., Senawong, G., Utaiwat, S., Yunchalard, S., Sattayasai, J. and Senawong, T.: Anti-inflammatory activity of the dietary supplement *Houttuynia cordata* fermentation product in RAW264.7 cells and Wistar rats, *PLOS ONE*, **15** (3): e0230645 (2020)
- 10) Li, W., Zhou, P., Zhang, Y. and He, L.: *Houttuynia cordata*, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity, *J. Ethnopharmacol.*, **133**, 922-927 (2011)
- 11) Chen, YY., Liu, JF., Chen, CM., Chao, PY. And Chang, TJ.: A study of the antioxidative and antimutagenic effects of *Houttuynia cordata* Thunb. using an oxidized frying oil-fed model, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **49**, 327-333 (2003)
- 12) 川村智子, 久田陽一, 奥田和代, 野呂征男, 田中俊弘, 吉田将士, 酒井英二: ジュウヤクの生薬学的研究 (1) ドクダミ中のフラボノイド配当体含量について, *生薬学雑誌*, **48**, 208-212 (1994)
- 13) 布施淳一, 金森久幸, 坂本征則, 矢原正治: ドクダミ中のフラボノール配糖体に関する研究, *生薬学雑誌*, **48**, 307-311 (1994)
- 14) 酒井英二, 柴田俊郎, 川村智子, 久田陽一, 野呂征男, 吉田将士, 田中俊弘: ジュウヤクの生薬学的研究 (2) 遮光条件下で栽培したドクダミの生育およびフラボノイド配糖体含

- 量, 生薬学雑誌, **50**, 45-48 (1996)
- 15) 春日敦子, 青柳康夫, 菅原龍幸: 食用植物の抗酸化性について, 日本食品工業学会誌, **35**, 828-834 (1988)
 - 16) Cho, E. J., Yokozawa, T., Rhyu, D. Y., Kim, S. C., Shibahara, N. and Park, J. C.: Study on the inhibitory effects of korean medicinal plants and their main compounds on the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Phytomedicine*, **10**, 544-551 (2003)
 - 17) Chou, S. C., Su, C. R., Ku, Y. C. and Wu, T. S.: The constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata*, *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 1227-1230 (2009)
 - 18) 立澤文見, 篠田浩一: フォトダイオードアレイ検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによるアントシアニンの同定と薄層クロマトグラフィーおよび分光高度計での吸収スペクトル特性を併用したアントシアニンの同定の比較, 園芸学研究, **4**, 225-228 (2005)
 - 19) 北尾 悟, 寺本円佳, 的場輝佳: ブドウ種子抽出物のラジカル捕捉能に及ぼす熟およびpHの影響と蒟蒻の製造, 日本食品科学工学会誌, **48**, 591-597 (2001)
 - 20) 食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会 (社団法人日本食品科学工学会) 編集, 平成19年度農林水産省補助事業 (食料産業クラスター展開事業) 食品機能性評価マニュアル集 第II集, 71-78, 社団法人日本食品科学工学会, つくば (2007)
 - 21) Florian, C. S., Andreas, S. and Reinhold, C.: Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose, *Food Chem.*, **77**, 101-106 (2002)
 - 22) Harborne, J. B.: The evolution of flavonoid pigments in plants. In *Comparative Phytochemistry*, Ed. Swain T., pp. 271-295, Academic Press, London (1996)
 - 23) 作田正明: ナデシコ目はなぜアントシアニンを合成しないのかーアントシアニン生合成の進化ー, 植物の生長調節, **44**, 49-55 (2009)
 - 24) 上海科学技术出版社・小学館編, 中薬大辞典 第一巻, 274-277, 小学館, 東京 (1998)
 - 25) Jiang, L., Zhang, S. and Xuan, L.: Oxanthrone C-glycosides and epoxynaphthoquinol from the roots of *Rumex japonicus*, *Phytochemistry*, **68**, 2444-2449 (2007)
 - 26) Tatsuzawa, F., Saito, N. and Yokoi, M.: Anthocyanins in the flowers of *Cymbidium Lindleyana*, **11**, 214-219 (1996)
 - 27) Tatsuzawa, F., Saito, N., Murata, N., Shinoda, K., Shigihara, A. and Honda, T.: 6-Hydroxypelargonidin glycosides in the orange-red flowers of *Alstroemeria*, *Phytochemistry*, **62**, 1239-1242 (2003)
 - 28) Torskangerpoll, K., Fossen, T. and Andersen, O. M.: Anthocyanin pigments of tulips, *Phytochemistry*, **52**, 1687-1692 (1999)
 - 29) Wang, H., Nair, M. G., Iezzoni, A. F., Strasburg, G. M., Booren, A. M. and Gray, H. I.: Quantification and characterization of anthocyanins in Balaton, Tart Cherries, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2556-2560 (1997)
 - 30) Watanabe, M.: An anthocyanin compound in buckwheat sprouts and its contribution to antioxidant capacity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 579-582 (2007)
 - 31) 加藤信行: 草本植物の紅葉におけるアントシアニンの定性とその分布, 新潟県生物教育研究会誌, **17**, 1-6 (1982)
 - 32) Mulabagal, V., Lang, G. A., DeWitt, D. L., Dalavoy, S. S. and Nair, M. G.: Anthocyanin content, lipidperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of sweet and sour cherries, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1239-1246 (2009)
 - 33) Nuengchamnong, N., Krittasilp, K. and Ingkaninan, K.: Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay, *Food Chem.*, **117**, 750-756 (2009)
 - 34) 太田静行編著, 食品と酸化防止剤, 105-133, 株式会社食品資材研究会 (東京) (1987)