

明 細 書

発明の名称：

二枚貝から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール（3、5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol）を生成する生成方法

技術分野

[0001] 本発明は、いわゆる濾過摂食性二枚貝の貝肉から抗酸化物質である3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3、5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol：以下DHMBAと称する。)を抽出して生成する生成方法に係り、特に、カキ以外の濾過摂食性二枚貝の貝肉からDHMBAを抽出して生成する生成方法に関するものである。

背景技術

[0002] カキ、たとえばマガキ(*Crassostrea gigas*)は、ウグイスガイ目イタボガキ科に属する二枚貝で、その生息地は日本を初めとして東アジア全域に及んでいる。近年では、フランスやオーストラリアでもマガキが養殖されており、世界で最も食用に供さるカキとして名高い。

カキは、栄養価が高いことから古代より食用にされてきたが、前述したとおりグリコーゲンやタンパク質のほか、カルシウム、亜鉛、セレンウム、銅、マンガンなどのミネラルを多量に含む。

また、カキ由来の抗酸化物として報告されているのは、酵素性抗酸化物質としてSOD、CAT、GPx、及びPrx6があり、非酵素性抗酸化物質としてはメタロチオネイン、uncoupling protein 5(UCP5)、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、 β -カロテンがあった。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開 2 0 1 0 － 1 9 3 7 5 6 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 近年、本件発明の発明者は、カキからの優れた新規抗酸化物質、DHMB Aを見出すことに成功し、さらにその化学構造を決定し、なおかつ前記抗酸化物質の化学合成を行うことにも成功し、そして、カキに由来しない、あるいはカキに由来する場合の双方での優れたいわゆる、DHMB Aを有効成分とする新規抗酸化剤及び抗酸化剤組成物の提供が行えることにも成功した。

さらに本件発明の発明者は、カキ以外の濾過摂食性二枚貝、例えばイガイ、タイラガイ、シロガイ、アカガイ、ホタテの貝肉からDHMB Aを抽出して生成することに成功したものである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明は、

カキ以外の二枚貝の貝肉を、抽出液内に入れ、該抽出液を加熱することにより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を前記加熱処理した二枚貝の貝肉液から生成する、
ことを特徴とし、

または、

カキ以外の二枚貝の貝肉を、95℃以上で1時間以上加熱することにより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を前記加熱処理したカキ肉を除く二枚貝の貝肉液より生成する、

ことを特徴とし、

または、

前記カキ以外の二枚貝の貝肉を、抽出溶液内に入れて貝肉エキスを抽出し、抽出した前記貝肉エキス抽出液を加熱し、加熱した抽出液を遠心分離して上澄みを取り出し、取り出した上澄みより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシ

ベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する

、

ことを特徴とし、

または、

前記カキ以外の二枚貝は、タイラガイ、シロガイ、アカガイ、イガイ、ホタテである、

ことを特徴とし、

または、

カキ以外の二枚貝の貝肉を、抽出液内に入れ、該抽出液を加圧することにより、3, 5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を前記加圧処理した二枚貝の貝肉液から生成する、

ことを特徴とし、

または、

前記加圧は、少なくとも1気圧以上である、

ことを特徴とし、

カキ以外の二枚貝の貝肉を、2気圧に加圧することにより、3, 5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を前記加圧処理したカキ肉を除く二枚貝の貝肉液より生成する、

ことを特徴とし、

または、

前記カキ以外の二枚貝の貝肉を、抽出溶液内に入れて貝肉エキスを抽出し、抽出した前記貝肉エキス抽出液を加圧し、加圧した抽出液を遠心分離して上澄みを取り出し、取り出した上澄みより、3, 5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する

、

ことを特徴とし、

または、

前記カキ以外の二枚貝は、タイラガイ、シロガイ、アカガイ、ホッキガイ

、ハマグリ、イガイ、ホタテである、
ことを特徴とするものである。

発明の効果

[0006] 本発明によれば、カキ以外の濾過摂食性二枚貝の貝肉から新規抗酸化物質であるDHMB Aを、前記濾過摂食性二枚貝の貝肉を加熱または加圧して抽出でき、生成出来るとの優れた効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]加熱することによりカキ以外の二枚貝から検出されたDHMB Aの検出結果を示す説明図である。

[図2]加圧することによりカキ以外の二枚貝から検出されたDHMB Aの検出結果を示すグラフである。

[図3]本発明の構成を説明する説明図である。

発明を実施するための形態

[0008] 以下、本発明を図に示す一実施例に基づいて説明する。

[0009] (加熱によるDHMB Aの抽出)

まず、カキ以外の大量の濾過摂食性二枚貝を用意した。そして、大量にある前記濾過摂食性二枚貝の中から所定種類の二枚貝を選び、その中から各々3個体を無作為に選択した。

その選択した二枚貝の種類は、タイラガイ、シロガイ、アカガイ、イガイ、ホタテに関する3個体である。

[0010] そして、それぞれのタイラガイ、シロガイ、アカガイ、イガイ、ホタテから貝肉、すなわちその軟体部を摘出し、重量の測定を行った。

[0011] 前記摘出したそれぞれ3個体分の軟体部をそれぞれ別々の収納器具（ビーカー）に入れ、該収納器具内に超純水あるいは純水を約90mL加えた後、ホモジナイズ処理を行った。

[0012] ここで、ホモジナイズ処理とは、貝肉の組織などを粉碎もしくは磨砕して

均一な懸濁状態にすることをいう。当該ホモジナイズ処理にはKINEMATICA社製ポリトロン PT10-35を使用した。

[0013] しかし、ホモジナイズ処理により液体状になった前記貝肉の軟体部を50 mL コーニングチューブ（アズワン株式会社）に適量入れ、再度重量を測定した。

[0014] また、前記ホモジナイズ処理した二枚貝軟体部の細胞膜を破壊することにより、抽出すべき抗酸化物質、DHMB Aの抽出状態を向上させるために、コーニングチューブ、例えば超音波洗浄機（ASU-10 アズワン株式会社製）を用いて約1時間の超音波処理を行った。

そして、約1時間経過後、各コーニングチューブから試料1 mLのサンプリングを行い、1.5 mL エッペンチューブにて保存した。

[0015] 次に、例えば、IHヒーター（KZ-PH3 National社製）を用いて約100℃程度、換言すれば95℃以上で加熱したお湯の中に各コーニングチューブを入れ、抗酸化物質、DHMB Aの加熱抽出（湯煎抽出）を行った。なお、加熱抽出は湯煎抽出に限定されない。

[0016] ここで、合計5時間の加熱を行った。サンプリングは1時間ごとに5回行った。サンプリング時には各コーニングチューブから試料1 mLのサンプリングを行い、1.5 mL エッペンチューブにて保存し、これらをTime = 1 ~ 5（T = 1時間~5時間）とした。

[0017] その後、前記サンプリングを行った各エッペンチューブについて遠心分離処理を行い、上澄みと沈殿物に分離した。そして、遠心分離した上澄みを別のエッペンチューブにて保存した。

[0018] 前記別のエッペンチューブにて保存した遠心分離後の上澄みの抗酸化物質、DHMB Aの濃度を測定した。この測定は、液体クロマトグラム/タンデム質量分析装置（LC-MS/MS : Prominence高圧グラジエントHPLC、トリプル四重極型質量計LCMS-8040システム、島津製作所）を用いて定量した。

[0019] ここで、抗酸化物質、DHMB Aの標準品（ウシオケミックス株式会社製）を純水に溶解させ、0.5、1、5、10、50 ng/mLの検量線用溶

液を調製した。

- [0020] 各試料は100倍希釈にてLC-MS/MSによる定量分析に供した。分離カラムはODSであるShim-Pack VP-ODS（長さ150 mm×内径2.0 mm、粒径5 μ m）を使用した。移動相A：0.05%酢酸水溶液、移動相B：アセトニトリルを用い、グラジエント分析（移動相B：0 min 5% → 5 min 100% → 7.5 min 5% → 12 min 5%）を行った。流速0.25 mL/min、カラムオープン温度40℃に設定した。
- [0021] 試料注入量1 μ Lとし、抗酸化物質、DHMBAはネガティブイオンモードにて検出した。定量分析には、プロダクトイオンスキャンを用いた。プロダクトイオンスキャンは、プリカーサーイオンとしてDHMBAの脱プロトン化イオン [M-H]⁻であるm/z 169.1を設定し、10V、20V、30Vにて分析を行った。
- [0022] 定量分析には、イオン化法にエレクトロスプレーイオン化法(Electrospray Ionization：ESI法)を用い、多重反応モニタリング(MRM)を用いた。MRMトランジションは、自動最適化により決定した。Q1/Q3=169.1/154.1(定量用トランジション)、169.1/136.9、169.1/125.1(定性用トランジション)を用いた。なお、それぞれのコリジョンエネルギーは、15V、28V、13Vに設定した。その他、MSのパラメーターとしてDL温度：250℃、ネブライザーガス：流量3 L/min、ヒートブロック温度：400℃、ドライイングガス流量：15 L/minとした。
- [0023] 以上の操作により、図1に示す検出結果が得られたものである。
- タイラガイについては、加熱後1時間経過後に、389.5 (ng/g)のDHMBAが得られた。加熱後2時間経過後には、758.3 (ng/g)のDHMBAが得られ、加熱後3時間経過後には、1127.6 (ng/g)のDHMBAが得られた。さらに、加熱後4時間経過後には、1660.7 (ng/g)のDHMBAが得られ、加熱後5時間経過後には、2186.3 (ng/g)のDHMBAが得られたことが確認された。
- [0024] また、シロガイについては、加熱後1時間経過後に、174.4 (ng/g)

g) のDHMB Aが得られた。加熱後2時間経過後には、368.0 (ng/g) のDHMB Aが得られ、加熱後3時間経過後には、645.4 (ng/g) のDHMB Aが得られた。さらに、加熱後4時間経過後には、928.0 (ng/g) のDHMB Aが得られ、加熱後5時間経過後には、1233.3 (ng/g) のDHMB Aが得られた。

[0025] さらに、アカガイについては、加熱後1～4時間の間はDHMB Aが得られなかったが、加熱後5時間経過後には、61.4 (ng/g) のDHMB Aが得られた。

[0026] また、イガイについては、加熱後1～4時間の間はDHMB Aが得られなかったが、加熱後5時間経過後には、122.6 (ng/g) のDHMB Aが得られた。

[0027] また、ホタテについては、加熱後1時間経過後は、DHMB Aが得られなかったが、加熱後2時間経過後には、75.4 (ng/g) のDHMB Aが得られ、加熱後3時間経過後には、148.7 (ng/g) のDHMB Aが得られた。さらに、加熱後4時間経過後には、257.8 (ng/g) のDHMB Aが得られ、加熱後5時間経過後には、393.3 (ng/g) のDHMB Aが得られた。

[0028] 上記のようにカキ以外の濾過摂食性二枚貝の貝肉からも抗酸化物質であるDHMB Aを、前記濾過摂食性二枚貝の貝肉を加熱することにより抽出でき、生成することが出来た。

[0029] (加圧によるDHMB Aの抽出)

まず、カキ以外の大量の濾過摂食性二枚貝を用意した。そして、大量にある前記濾過摂食性二枚貝の中から所定種類の二枚貝を選び、その中から各々3個体を無作為に選択した。

その選択した二枚貝の種類は、タイラガイ、シロガイ、アカガイ、ホッキガイ、ハマグリ、イガイ、ホタテに関する3個体である。

[0030] そして、それぞれのタイラガイ、シロガイ、アカガイ、ホッキガイ、ハマグリ、イガイ、ホタテから貝肉、すなわちその軟体部を摘出し、重量の測定

を行った。

[0031] 前記摘出したそれぞれ3個体分の軟体部をそれぞれ別々の収納器具（ビーカー）に入れ、該収納器具内に超純水あるいは純水を約90 mL加えた後、ホモジナイズ処理を行った。ここで、ホモジナイズ処理とは、貝肉の組織などを粉碎もしくは磨砕して均一な懸濁状態にすることを指標とする。

[0032] 当該ホモジナイズ処理にはKINEMATICA社製ポリトロン PT10-35を使用した。しかして、ホモジナイズ処理により液体状になった前記貝肉の軟体部を50 mL コーニングチューブ（アズワン株式会社）に適量入れ、再度重量を測定した。

[0033] また、前記ホモジナイズ処理した二枚貝軟体部の細胞膜を破壊することにより、抽出すべき抗酸化物質、DHMB Aの抽出状態を向上させるために、コーニングチューブ、例えば超音波洗浄機（ASU-10 アズワン株式会社製）を用いて約1時間の超音波処理を行った。

[0034] そして、約1時間経過後、各コーニングチューブから試料1 mLのサンプリングを行い、1.5 mL エッペンチューブにて保存した。

[0035] 次に、前記試料を2気圧に加圧して抽出した。尚、本件発明者は2気圧に加圧してDHMB Aの抽出作業を行ったが、この2気圧の加圧に限定されるものではなく、1気圧以上に加圧すればDHMB Aが抽出されるものとなる。

[0036] また、加圧方法についても何ら限定されない。一般的な方法である加圧釜を使用して行って加圧しても構わない。また、ほかの方法で加圧しても構わない。

[0037] ここで、合計5時間の加圧を行った。サンプリングは1時間ごとに5回行った。サンプリング時には各コーニングチューブから試料1 mLのサンプリングを行い、1.5 mL エッペンチューブにて保存し、これらをTime = 1 ~ 5（T = 1時間 ~ 5時間）とした。

[0038] その後、前記サンプリングを行った各エッペンチューブの遠心分離処理を行い、遠心分離した上澄みを別のエッペンチューブにて保存した。

- [0039] そして、前記別のエッペンチューブにて保存した遠心分離後の上澄み中の抗酸化物質、DHMB Aの濃度を計測した。その濃度について、液体クロマトグラム/タンデム質量分析装置(LC-MS/MS : Prominence高圧グラジェントHPLC、トリプル四重極型質量計LCMS-8040システム、島津製作所)を用いて定量した。
- [0040] ここで、抗酸化物質、DHMB Aの標準品(ウシオケミックス株式会社製)を純水に溶解させ、0.5、1、5、10、50 ng/mLの検量線用溶液を調製した。
- [0041] 各試料は100倍希釈にてLC-MS/MSによる定量分析に供した。分離カラムはODSであるShim-Pack VP-ODS(長さ150 mm×内径2.0 mm、粒径5 μm)を使用した。移動相A: 0.05%酢酸水溶液、移動相B: アセトニトリルを用い、グラジェント分析(移動相B: 0 min 5% → 5 min 100% → 7.5 min 5% → 12 min 5%)を行った。流速0.25 mL/min、カラムオープン温度40℃に設定した。
- [0042] 試料注入量1 μLとし、抗酸化物質、DHMB Aはネガティブイオンモードにて検出した。定量分析には、プロダクトイオンスキャンを用いた。プロダクトイオンスキャンは、プリカーサーイオンとしてDHMB Aの脱プロトン化イオン[M-H]⁻であるm/z 169.1を設定し、10 V、20 V、30 Vにて分析を行った。
- [0043] 定量分析には、イオン化法にエレクトロスプレーイオン化法(Electrospray Ionization : ESI法)を用い、多重反応モニタリング(MRM)を用いた。MRMトランジションは、自動最適化により決定した。Q1/Q3=169.1/154.1(定量用トランジション)、169.1/136.9、169.1/125.1(定性用トランジション)を用いた。なお、それぞれのコリジョンエネルギーは、15 V、28 V、13 Vに設定した。その他、MSのパラメーターとしてDL温度: 250℃、ネブライザーガス: 流量3 L/min、ヒートブロック温度: 400℃、ドラインガス流量: 15 L/minとした。
- [0044] 以上の操作により、図2に示す検出結果が得られたものである。
タイラガイについては、加圧後1時間経過後に、735.9 (ng/g)

のDHMB Aが得られた。加圧後2時間経過後には、1711.7 (ng/g)のDHMB Aが得られ、加圧後3時間経過後には、2774.7 (ng/g)のDHMB Aが得られた。さらに、加圧後4時間経過後には、5163.8 (ng/g)のDHMB Aが得られ、加圧後5時間経過後には、7073.4 (ng/g)のDHMB Aが得られたことが確認された。

[0045] また、シロガイについては、加圧後1時間経過後に、1063.3 (ng/g)のDHMB Aが得られた。加圧後2時間経過後には、1502.4 (ng/g)のDHMB Aが得られ、加圧後3時間経過後には、2276.7 (ng/g)のDHMB Aが得られた。さらに、加圧後4時間経過後には、2190.3 (ng/g)のDHMB Aが得られ、加圧後5時間経過後には、3809.5 (ng/g)のDHMB Aが得られた。

[0046] さらに、アカガイについては、加圧後1～2時間の間はDHMB Aが得られなかったが、加圧後3時間経過後には、131.9 (ng/g)のDHMB Aが得られた。さらに、加圧後4時間経過後には、234.2 (ng/g)のDHMB Aが得られ、加圧後5時間経過後には、416.7 (ng/g)のDHMB Aが得られた。

[0047] また、ホッキガイについても、加圧後1～2時間の間はDHMB Aが得られなかったが、加圧後3時間経過後には、228.4 (ng/g)のDHMB Aが得られた。さらに、加圧後5時間経過後には、175.8 (ng/g)のDHMB Aが得られた。

[0048] また、ハマグリについては、加圧後1～3時間の間はDHMB Aが得られなかったが、加圧後4時間経過後には、109.9 (ng/g)のDHMB Aが得られた。さらに、加圧後5時間経過後には、236.0 (ng/g)のDHMB Aが得られた。

[0049] また、イガイについては、加圧後1～2時間の間はDHMB Aが得られなかったが、加圧後3時間経過後には、268.3 (ng/g)のDHMB Aが得られた。そして、加圧後4時間経過後には、390.2 (ng/g)のDHMB Aが得られた。さらに、加圧後5時間経過後には、742.0 (ng/g)のDHMB Aが得られた。

g/g)のDHMB Aが得られた。

[0050] また、ホタテについては、加圧後1時間経過後は、169.7 (ng/g)のDHMB Aが得られ、加圧後2時間経過後には、237.4 (ng/g)のDHMB Aが得られ、加圧後3時間経過後には、387.7 (ng/g)のDHMB Aが得られた。さらに、加圧後4時間経過後には、436.6 (ng/g)のDHMB Aが得られ、加圧後5時間経過後には、731.4 (ng/g)のDHMB Aが得られた。

[0051] 上記のようにカキ以外の濾過摂食性二枚貝の貝肉からも抗酸化物質であるDHMB Aを、前記濾過摂食性二枚貝の貝肉を加圧することにより抽出でき、生成することが出来た。

請求の範囲

- [請求項1] カキ以外の二枚貝の貝肉を、抽出液内に入れ、該抽出液を加熱することにより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3、5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を前記加熱処理した二枚貝の貝肉液から生成する、
- ことを特徴とするカキ以外の二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3、5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。
- [請求項2] カキ以外の二枚貝の貝肉を、95℃以上で1時間以上加熱することにより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3、5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を前記加熱処理したカキ肉を除く二枚貝の貝肉液より生成する、
- ことを特徴とする二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3、5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。
- [請求項3] 前記カキ以外の二枚貝の貝肉を、抽出溶液内に入れて貝肉エキスを抽出し、抽出した前記貝肉エキス抽出液を加熱し、加熱した抽出液を遠心分離して上澄みを取り出し、取り出した上澄みより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3、5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する、
- ことを特徴とする請求項1または請求項2記載のカキ以外の二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3、5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。
- [請求項4] 前記カキ以外の二枚貝は、タイラガイ、シロガイ、アカガイ、イガイ、ホタテである、

ことを特徴とする請求項1、請求項2または請求項3記載のカキ以外の二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。

[請求項5] カキ以外の二枚貝の貝肉を、抽出液内に入れ、該抽出液を加圧することにより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を前記加圧処理した二枚貝の貝肉液から生成する、

ことを特徴とするカキ以外の二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。

[請求項6] 前記加圧は、少なくとも1気圧以上である、

ことを特徴とする請求項5記載のカキ以外の二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。

[請求項7] カキ以外の二枚貝の貝肉を、2気圧に加圧することにより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を前記加圧処理したカキ肉を除く二枚貝の貝肉液より生成する、

ことを特徴とする二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。

[請求項8] 前記カキ以外の二枚貝の貝肉を、抽出溶液内に入れて貝肉エキスを抽出し、抽出した前記貝肉エキス抽出液を加圧し、加圧した抽出液を

遠心分離して上澄みを取り出し、取り出した上澄みより、3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する、

ことを特徴とする請求項5または請求項6記載のカキ以外の二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。

[請求項9]

前記カキ以外の二枚貝は、タイラガイ、シロガイ、アカガイ、ホッキガイ、ハマグリ、イガイ、ホタテである、

ことを特徴とする請求項5、請求項6、請求項7または請求項8記載のカキ以外の二枚貝の貝肉から3、5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアルコール(3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol)を生成する生成方法。