

橘の機能性成分の調査研究（第2報）

岡本 雄二^{*1)}, 清水 浩美^{*2)}

Research on a Functionality Ingredient of Citrus Tachibana (2nd Report)

OKAMOTO Yuji ^{*1)}, SHIMIZU Hiromi ^{*2)}

橘を利用した機能性食品の開発を目標に、橘に含まれる機能性成分の分析および評価を行った。

橘のカロテノイド類含有量は、ウンシュウミカンの4割程度であった。ORAC法による抗酸化能の評価では、橘は未熟果や葉で高く、成熟果ではウンシュウミカンと同程度の抗酸化能を有していた。部位別では果皮部で高く、水溶性の画分に抗酸化成分が多く含まれていることが示唆された。橘果実および葉のエタノール抽出物に α -グルコシダーゼ阻害活性が見られ、阻害成分はポリフェノール類であることが示唆された。また、葉の水抽出物に高いACE阻害率が見られ、阻害成分はポリフェノール類以外の水溶性成分であると考えられた。

1. 緒言

高齢化社会の進行とともに生活習慣病の発症が高まっている我が国では、食品のもつ生理機能への関心が高まっている。カンキツ類は古くから生薬としても利用され、特徴的な成分を多く含み、生体機能性の研究が進んでいる。

カンキツ類の一種である橘は、日本書紀などにも登場し、奈良県に縁のある植物である。別名ヤマトタチバナとも呼ばれ、近年、県内各所で植樹活動が行われている。しかし、橘の果実は甘味がなく独特の苦味があることから生食用には不向きであり、その利用法や加工法の開発が求められている。

そこで当センターでは、平成27年度から橘を利用した機能性食品の開発を目標に研究を行い、これまでに橘に含まれるフラボノイド類や香り成分について、収穫時期や部位別に分析を行ってきた¹⁾。今回は、橘に含まれるカロテノイド類(β -クリプトキサンチン、 α -カロテン、 β -カロテン)の分析を行うとともに、酸素ラジカル吸収能(ORAC法)により抗酸化性を評価した。また、橘の血糖値上昇抑制効果として α -グルコシダーゼ阻害活性を、高血圧上昇抑制効果としてアンジオテンシンI変換酵素(以下、ACEと記す。)阻害活性を測定したので報告する。

2. 実験方法

2.1 供試試料

試料とした橘の果実および葉は、平成26年度は明日香村で、27年度および28年度は大和郡山市で採取したものをを用いた。また試料の一部は、凍結真空乾燥機(日本真空技術(株)製 DF-01H)を用いて凍結乾燥(以下、FDと記す。)した後、粉砕器を用いて粉砕し、ふるいで0.5mm以下に粒径をそろえ、分析まで冷凍保存し使用した。

2.2 カロテノイド類の分析

カロテノイド類の分析は、熊谷²⁾の方法を一部改変し行った。すなわち、生果実2gまたはFD試料0.2gに溶媒1(30g/Lピロガロール-エタノール溶液)15mLおよび硫酸ナトリウム10gを加え攪拌、5分間回転抽出後、遠心分離(10,000rpm×5min)し、上澄みを回収した。さらに、沈殿物に溶媒1を15mL加えて、上記と同様に攪拌、抽出し上澄みを回収する操作を2回繰り返した。上澄みを合わせた抽出液を溶媒1で50mLに定容後、10mLを採取し、60%水酸化カリウム溶液1mLを加え、5分おきに攪拌しながら70°Cで30分間加熱した。室温まで水冷後、1%塩化ナトリウム溶液20mL、2-プロパノール5mLおよび溶媒2(n-ヘキサン-酢酸エチル(9:1)混液)12mLを加え攪拌後、十分静置し上澄みを回収した。さらに、沈殿物に溶媒2を12mL加えて上記と同様に攪拌、抽出し上澄みを回収する操作を2回繰り返した。上澄みを合わせた回収液をロータリーエバポレーターを用いて乾固後、ノール1mLを加え再溶解し回収した。この操作を3回実施後、エタノールで5mLに定容し、メンブレンフィルターを用いてろ過した試料を分析試料とした。定量には高速液体クロマトグラフ(株島津製作所製 LC=20 シリーズ以下、HPLCと記す。)を用いた。分析条件は表1のとおりである。 β -クリプトキサンチンのスタンダードはフナコシ製を、 α -カロテンおよび β -カロテンは和光純薬工業製を用いた。

表1 カロテノイド類の分析条件

カラム	YMC-Pack C18, S-5, 4.6mm×150mm
カラム温度	40°C
流速	1.0 mL/min
試料注入量	10 μ L
移動相	4%クロロホルム含有メタノール (50 μ g/mL/パルミチン酸アスコルビル含有)
検出器	UV-VIS検出器(455nm)
同定	リテンションタイム及びスペクトル
定量	絶対検量線法

^{*1)} バイオ・食品グループ(現環境省) ^{*2)} バイオ・食品グループ

2.3 ORAC 法による抗酸化能評価

FD 試料 0.5g に n-ヘキサジクロロメタン (1:1) 混液 10mL を加え攪拌後, 遠心分離 (3,000rpm×10min) し, 上澄みを回収した. さらに, 沈殿物に n-ヘキサジクロロメタン (1:1) 混液を 10mL 加えて, 上記と同様に攪拌, 抽出し上澄みを回収した. 上澄みを合わせた回収液をロータリーエバポレーター (ヤマト科学製 RE500) を用いて濃縮乾燥後, ジメチルスルホキシド 4mL を加え再溶解した. メンブレンフィルターを用いてろ過後, ジメチルスルホキシドで 5mL に定容したものを L-ORAC (親油性抗酸化能) 分析試料とした.

続いて, 上記抽出後の固体沈殿物に, MWA 溶液 (メタノール: 蒸留水: 酢酸 (90:9.5:0.5)) 10mL を加え攪拌後, 超音波洗浄機を用いて 5 分間処理し抽出した. 10 分間静置し攪拌後, 遠心分離 (3,000rpm×10min) し, 上澄みを回収した. さらに, 沈殿物に MWA 溶液を 10mL 加えて, 上記と同様に攪拌, 抽出し上澄みを回収した. 上澄みを合わせた抽出液をメンブレンフィルターでろ過後, MWA 溶液で 25mL に定容したものを H-ORAC (親水性抗酸化能) 分析試料とした.

ORAC 法による分析は渡辺ら^{3) 4)}の方法を一部改変し行った. すなわち, 96 穴マイクロプレートに適宜希釈した分析試料 35 μ L, Fluorescein 溶液 (L-ORAC では 77.5nmol/L, H-ORAC では 110.7nmol/L) 115 μ L を加え, 37°C に保ったマルチモード・プレートリーダー (BioTex 製 Synergy HTX) を用い, 蛍光強度 (Em:485/20nm, Ex:528/20nm) を測定した.. その後 AAPH 溶液を 50 μ L 加え, 振とう攪拌し, 添加 2 分後から 2 分間隔で蛍光強度の経時変化を測定した (L-ORAC では 120 分間, H-ORAC では 90 分間).

総 OLAC 値は, L-ORAC および H-ORAC の合計値とし, 乾燥重量 1g あたりの Trolox 相当量 (μ mol of TE/g-乾燥重量) として算出した.

2.4 α -グルコシダーゼ阻害活性

(1) 抽出および阻害率の測定

FD 試料 100mg にエタノール 20mL を加え攪拌, 一晚静置抽出後, 遠心分離 (3,000rpm×10min) し, 上澄みを回収した. 回収液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾燥後, 0.2M リン酸 Na 緩衝液 (pH6.8) (以下, Buffer 1 と記す.) 1mL に再溶解した. 遠心分離 (3,000rpm×10min) 後, 上澄みをディスクろ過し, 分析試料とした.

各分析試料の *in vitro* での α -グルコシダーゼ阻害活性は, 以下の方法で求めた. 適宜希釈した分析試料 100 μ L に, 100U/mL に調整した α -グルコシダーゼ (ナカライテスク製, AGH-211) 酵素液 10 μ L および蒸留水 390 μ L を添加し, 37°C で 5 分間プレインキュベートした. 基質として 4% マルトース 500 μ L を添加し, 37°C で 30 分間インキュベート後, 1mol/L の塩酸 1mL を添加し反応を停止した. 攪拌後,

1mol/L の水酸化ナトリウムを 1mL を添加し中和した. 上記試料 10 μ L をとり, グルコース CII-テストワコー (和光純薬製) を用いて, 505nm の吸光度からグルコース量を測定した. α -グルコシダーゼ阻害率は, 下記の式を用いて算出した.

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (S - SB) / (C - CB)\} \times 100$$

S : Sample の 505nm における吸光度

SB : Sample Blank の 505nm における吸光度

C : Control の 505nm における吸光度

CB : Control Blank の 505nm における吸光度

(2) 阻害成分の推定

植物に広く存在するポリフェノール類のなかには, α -グルコシダーゼ阻害活性を有するものがあることが知られている. そこで, 活性を阻害する成分がポリフェノール類かどうか調べるため, ポリフェノールを特異的に吸着する特性を持つポリビニルポリピロリドン (以下, PVPP と記す.) を用いて, ポリフェノール吸着前後の阻害活性を評価した. 上記 (1) で用いた分析試料 1mL に PVPP 100mg を加え, 5 分おきにボルテックスによる攪拌を計 6 回行った後, 遠心分離 (800G×10min, 4°C) を行い, 得られた上清をポリフェノール吸着後の分析試料とした. ポリフェノール吸着後の α -グルコシダーゼ阻害活性は, 上記 (1) と同様に算出した.

2.5 ACE 阻害活性測定

分析試料の調整は, エタノール抽出および水抽出の 2 通りを行った. エタノール抽出は, 「2.4 α -グルコシダーゼ阻害活性測定」と同様に行ったが, 濃縮乾燥後に Buffer 1 ではなく, 0.1M NaCl 含有 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH8.3) (以下, Buffer 2 と記す.) に再溶解し, 分析試料とした. 水抽出は, FD 試料 50mg に蒸留水 1mL を加え攪拌後, バイオシェーカーで攪拌抽出 (1,000rpm×30min, 37°C) した. 遠心分離 (3,000rpm×10min) 後, 上澄みをディスクろ過し, 分析試料とした.

各分析試料の *in vitro* での ACE 阻害活性は, 河村⁵⁾の方法を改変し行った. ACE 酵素液は, ウサギ肺由来アセトンパウダー (SIGMA-ALDRICH 製, L0756) 1g に Buffer 2 を 20 mL 加え, 4°C で 24 時間攪拌後, 遠心分離 (9,060G×15min) して得た上澄み液を, Buffer 2 で 4 倍希釈し用いた. 上記 ACE 酵素液 50 μ L に Buffer 2 および分析試料をそれぞれ 50 μ L 添加し, 37°C で 5 分間プレインキュベートした. Buffer 2 で 10mM に調整した Bz-Gly-His-Leu 合成基質 (ペプチド研究所製, 3064) 50 μ L を添加し, 37°C で 60 分間インキュベート後, 5mol/L の塩酸 25 μ L を添加し反応を停止した.

攪拌後, 酢酸エチル 800 μ L を加え攪拌, 遠心分離 (10,000rpm×5min) した. 上記試料の内, 酢酸エチル層 500 μ L をとり, 遠心エバポレーター (Yamato 製 RE-500) を用いて酢酸エチルを除去後, 蒸留水 500 μ L を添加し攪拌

表 2 カロテノイド類含有量

単位 mg/100g-新鮮重量

	H26 橘				H27 橘		H28 橘	ウンシュウミカン
	全体	果皮部	果肉部	種子	全体	葉 (6月)	全体	全体
β-クリプトキサンチン	0.4	0.4	0.1	0.1	0.4	Tr	0.4	1.6
α-カロテン	-	-	-	-	-	1.3	-	-
β-カロテン	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	1.7	Tr	Tr

表 3 季節別の各 ORAC 値

単位 μmol TE/g-乾燥重量

	未熟果 (全体)	成熟果 (全体)	H27 橘			ウンシュウミカン 成熟果 (全体)
			葉 (6月)	葉 (9月)	葉 (12月)	
L-ORAC	68.1	21.1	57.7	50.7	57.9	18.3
H-ORAC	517.2	309.0	839.8	503.0	729.3	317.5

した。遠心分離 (10,000rpm×10min) 後、上済み 250μL を 96 穴マイクロプレートにとり、マルチモード・プレートリーダーを用い、吸光測定 (228nm) した。ACE 阻害率は、下記の式を用いて算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (S - SB) / (C - CB)\} \times 100$$

S : Sample の 228nm における吸光度

SB : Sample Blank の 228nm における吸光度

C : Control の 228nm における吸光度

CB : Control Blank の 228nm における吸光度

3. 結果および考察

3.1 カロテノイド類含有量

橘成熟果の部位別および年度別のカロテノイド類含有量を表 2 に示す。ビタミン A 活性を持つ β-クリプトキサンチンはウンシュウミカンに多く含まれていることが知られており、骨代謝を指標とした骨の健康維持に効果があることが報告されている²⁾。橘成熟果 (全体) の β-クリプトキサンチン含有量は、ウンシュウミカンの成熟果 (全体) の 4 割程度であった。また、橘の β-クリプトキサンチンは果皮部に多く含まれていた。α-カロテンは葉部以外では検出されず、β-カロテンも葉部以外では、0.1mg/100g-新鮮重量以下であった。

3.2 抗酸化能

平成 27 年度の橘果実および葉の季節別の抗酸化能について、各 ORAC 値を表 3 および図 1 に示す。成熟果に比べ未熟果の抗酸化能が高く、葉については 6 月採取が高かった。また、各試料とも L-ORAC および H-ORAC の合計値である総 ORAC 値に対して、H-ORAC 値が 9 割近くを占めており、水溶性の画分に抗酸化成分の主体が含まれている

表 4 部位別の ORAC 値 単位 μmol TE/g-乾燥重量

	H28 橘			
	全体	果皮部	果肉部	種子
L-ORAC	12.0	18.7	1.7	11.7
H-ORAC	193.5	223.7	90.8	31.0

ことが示唆された。しかし、L-ORAC 値は多くの果実で 5% 以下であるという報告もあり⁹⁾、それと比較すると親油性の画分にも抗酸化成分が多く見られた。これは、果実試料として果実全体を用い、果皮部が含まれていたためと思われる。

そこで、平成 28 年度の橘成熟果の部位別の各 ORAC 値について評価した。その結果を表 4 に示す。部位別では、L-ORAC および H-ORAC 値とも果皮部が高かった。

3.3 α-グルコシダーゼ阻害活性

α-グルコシダーゼは、デンプンが分解されて生じるマルトースなどの二糖類を分解しグルコースを遊離する酵素である。生じたグルコースは血液に吸収され、血液中の血糖値が上昇する。そのため、α-グルコシダーゼ活性を阻害することができれば、生じるグルコース量が減り、食後の血糖値上昇を抑制することができる。

平成 26~28 年度の橘果実および葉の α-グルコシダーゼ阻害率を図 2 に、活性を 50% 阻害するために必要な試料濃度 IC₅₀ 値 (mg/mL) を表 5 に示す。いずれの試料においても濃度依存的に阻害率が上昇し、IC₅₀ 値は 1.9~3.2 mg/mL であった。また、橘成熟果の年度別で比較すると阻害率に大きな差は見られず、ウンシュウミカンと同程度であった (図 2 a)。季節別では、未熟果が成熟果に比べ、阻害率が

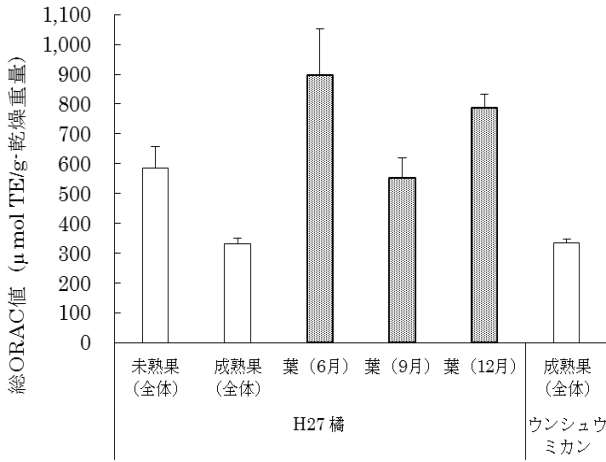


図 1 季節別の総 ORAC 値

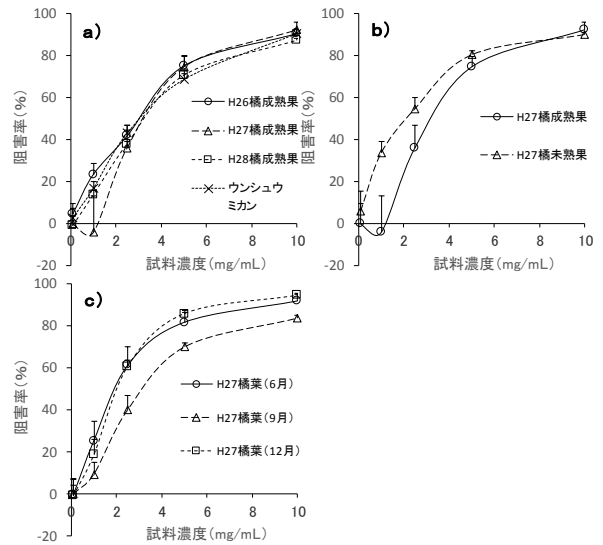


図 2 α-グルコシダーゼ阻害率

a) 年度別 (成熟果) b) 橘果実 c) 橘葉

表 5 IC₅₀ 値

単位 mg/mL

IC ₅₀ 値	H26 橘	H27 橘					H28 橘	ウンシュウミカン成熟果 (全体)
	成熟果 (全体)	未熟果 (全体)	成熟果 (全体)	葉 (6月)	葉 (9月)	葉 (12月)	成熟果 (全体)	
IC ₅₀ 値	3.0	2.0	3.2	1.9	3.1	2.0	3.2	3.0

高く、葉は6月および12月の阻害率が高かった (図2bおよびc)。

次に試料濃度 5mg/mL におけるポリフェノール吸着前後の α-グルコシダーゼ阻害率を表6に示す。橘果実および葉とともに、ポリフェノール吸着後の阻害率が大きく低下したことから、阻害成分は橘に含まれるポリフェノール類であることが示唆された。

3.4 ACE 阻害活性

ACE は、アンジオテンシン I を II へ変換する酵素である。アンジオテンシン II は、末梢毛細血管を収縮させることで、直接的に血圧を上昇させるだけでなく、副腎でアルドステロンの分泌を高め、Na や水の貯留量増大を引き起こすなど、間接的な血圧上昇にも関与する。そのため、ACE 活性を阻害することができれば、アンジオテンシン II の増加を防ぎ血圧の上昇を抑制することができる。

橘果実および橘葉の水抽出物の ACE 阻害率を図3に示す。橘果実は H26~28 成熟果 (全体)、橘葉は H27 橘葉 (6~12 月) の平均値である。試料濃度 1.25mg/mL 以上の橘葉において高い ACE 阻害活性が見られた。そこで、PVPP を用いて 2.4 (2) と同様の方法で、試料濃度 1.25mg/mL における橘葉(6 月)のポリフェノール吸着前後の ACE 阻害率を測

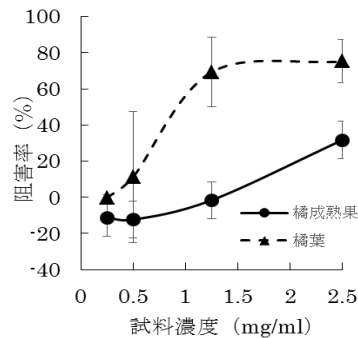


図 3 ACE 阻害率

定した (表7)。吸着後の阻害率が上昇したことから、阻害成分はポリフェノール類以外であることが示唆された。また、橘果実および橘葉のエタノール抽出物については、ACE 阻害活性が見られなかったため、阻害成分は親水性の成分であると思われる。

4. 結言

橘を利用した機能性食品の開発を目標に、橘に含まれる機能性成分の分析および評価を行い、以下の結果を得た。

表 6 ポリフェノール吸着前後の阻害率 単位 %

	H27 橘 成熟果 (全体)	H27 橘 葉 (全体)
吸着前	75	82
吸着後	9	5

- (1) カロテノイド類について、 β -クリプトキサンチン含有量はウンシュウミカンの4割程度であり、果皮部に多く含まれていた。 α -カロテンは葉部以外では検出されず、 β -カロテンも葉部以外では、0.1mg/100g-新鮮重量以下であった。
- (2) ORAC 法による抗酸化能評価では、成熟果に比べ未熟果の抗酸化能が高く、部位別では果皮部が高かった。また、葉は6月採取が高かった。ほとんどの試料において総 ORAC 値に対して、H-ORAC 値が9割近くを占めており、水溶性の画分に抗酸化成分の主体が含まれていることが示唆された。
- (3) 橘果実および葉のエタノール抽出物に α -グルコシダーゼ阻害活性が見られ、 IC_{50} 値は 1.9~3.2 mg/mL であった。また、阻害成分としてポリフェノール類であることが示唆された。
- (4) 橘葉の水抽出物に ACE 阻害活性が見られた。また、阻害成分としてポリフェノール類以外の親水性の成分であることが示唆された。

以上のことから、橘には果実や葉に機能性があることが期待でき、それを活用する商品開発のための研究を今後も進めていきたい。

表 7 ポリフェノール吸着前後の ACE 阻害率 単位 %

	吸着前	吸着後
H27 橘 葉 (6月)	66	82

謝辞

本研究を進めるにあたり、なら橘プロジェクト推進協議会の城会長をはじめ、橘試料を提供頂いた関係者には、多大な配慮とご協力をいただき、深謝いたします。

参考文献

- 岡本雄二, 首藤明子, 清水浩美, 橘の機能性成分の調査研究 (第1報), 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.42, 19-23, 2016
- 熊谷雅孝, ウンシュウミカンの β -クリプトキサンチン測定法, 食品機能性評価マニュアル (IV)
- 渡辺純, 箭田浩士, 沖智之, 竹林純, L-ORAC 分析法標準作業手順, 食品機能性評価マニュアル (IV)
- 渡辺純, 沖智之, 竹林純, H-ORAC 分析法標準作業手順, 食品機能性評価マニュアル (IV)
- 河村幸雄, アンギオテンシン変換酵素阻害, 食品機能研究法, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編, 光琳, 109-112, 2000
- 木村英生, 樋口かよ, 小嶋匡人, 橋本卓也, 地域特産物の抗酸化力向上に関する研究, 山梨県工業技術センター研究報告, No.25, 2011