

和梨ポリフェノールの抗酸化活性

誌名	山形県工業技術センター報告
ISSN	0286813X
著者名	岩松,新之輔 安食,雄介 石塚,健
発行元	山形県工業技術センター
巻/号	36号
掲載ページ	p. 46-50
発行年月	2005年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



和梨ポリフェノールの抗酸化活性

岩松新之輔 安食雄介 石塚 健

Antioxidant Activity of Japanese Pear Polyphenols

Shinnosuke IWAMATSU Yusuke AJIKI Ken ISHIZUKA

1 緒言

近年、長引く不況により製造業全体の出荷額が落ち込んでいる中、健康食品市場は右肩上がりの成長を続けている。市場規模の拡大に伴い、製品の効果・効能、安全性などに関する科学的検証と情報提供の重要性は増し、厚生労働省が健康機能や安全性を承認、表示を許可した特定保健用食品は、その信頼性の高さから消費者の支持を得て、健康食品市場の約50%を占めるまで売り上げが伸びてきている。

このような状況下、食品関連企業は生き残りをかけて、新規機能性食品の研究開発に取り組んでいる。本県においても、機能性食品開発の気運が高まっているが、中小零細企業が大部分を占め、企業単独で健康効果の解明や応用研究を実施することは困難である。

そこで、我々は、幅広く食品に応用できる機能性食品素材を開発するため、地域で生産されている農水産物のポリフェノールに着目し、その含有量と抗酸化性を指標として有望素材の調査を行った。この中で和梨未熟果が有望な素材であることを見出し、そのポリフェノール個別成分を解明するとともに、成熟過程の含有量変化や抗酸化性などについて知見を得た。さらに、和梨未熟果からのポリフェノール抽出条件と抽出液の有機酸、糖の組成分析を行ったので、その結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試料

試料には山形県砂丘地農業試験場で栽培、収穫された和梨（幸水）を用いた。未熟果は5月24日、5月31日、6月7日、6月14日、6月21日、6月28日、8月8日、成熟果は9月6日に採取し、直ちに重量及び直径を測定した。

2.2 和梨からのポリフェノール抽出

試料からのポリフェノール抽出溶媒には、水、熱水、80%エタノールを用いた。試料に10倍量の抽出溶媒を添加し、ジューサーミキサーで1min 破碎した。その後、遠心分離（11000rpm,15min,10℃）、ろ過（ろ紙 NO.5A）により不溶物を除去し、得られたろ液をポリフェノール抽出液として以後の実験に用いた。また、熱水抽出は、遠心分離前に100℃の湯浴中で1h加熱処理することにより行った。

2.3 ポリフェノール含有量の測定

総ポリフェノール量測定には、Folin-Denis法を用いた¹⁾。蒸留水3.2ml、抽出液0.2ml、フェノール試薬（Wako）0.2mlを混合し、0.4mlの飽和炭酸ナトリウム溶液を加えよく攪拌した。その後、室温で30min反応させ、反応液の725nmの吸光度を測定した。総ポリフェノール量は、(+)-カテキンの換算値として算出した。

2.4 DPPH ラジカル消去活性

有色安定ラジカル DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) の抽出液による退色により、抗酸化活性を測定した²⁾。0.4mM DPPH 0.9ml, 200mM MES buffer (pH6.0) 0.9ml, エタノール0.9mlをボルテックスミキサーで混合し、ついで適宜希釈した試料液を0.9ml加えた。その後、室温で20min反応させ、反応液の520nmの吸光度を測定した。標準物質には(+)-カテキンを用い、ブランクには試料溶液の代わりに蒸留水を用いた。測定結果より、試料溶液及び(+)-カテキンにおける、ブランク吸光度の50%

の値を示す濃度 (IC50) を算出し、ラジカル消去活性とした。

2.5 スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様活性

キサンチンオキシダーゼがキサンチンを酸化し、生成したスーパーオキシドが NBT を還元してブルーフォルマザンを生成することを利用して、SOD 様活性を測定した³⁾。50mM 炭酸ナトリウム buffer (pH10.2) 2.4ml, 0.75mM NBT, 3.0mM キサンチン, 3.0mM EDTA, 0.15% BSA さらに適宜希釈した試料, 各 0.1ml を混合, 25°C で 10min 静置した。ついでキサンチンオキシダーゼを 0.1ml 加え, 20min 静置した後, 6mM 塩化銅を 0.1ml 加え, 560nm の吸光度を測定した。なお, ブランクには試料の代わりに炭酸ナトリウム buffer を用いた。測定結果より, 試料溶液及び(+)-カテキンにおける, ブランク吸光度の 50% の値を示す濃度 (IC50) を算出し, その濃度を SOD 様活性 1unit とした。

2.6 和梨ポリフェノールの推定

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により和梨ポリフェノールの推定を行った。HPLC システムは, JASCO-BORWIN/DP-L2000W (日本分光) を用いた。分析条件は以下のとおり。カラム: CrestPak C18T-5 (I.D.4.6mm×250mm, 日本分光), 流速: 1.0ml/min, 移動相: pH6.0, 100mM リン酸バッファー (7% メタノールを含む), 検出: UV 280nm

2.7 抽出液の安定化試験

シクロデキストリン (塩水港精糖, デキシパール K-100) の 1%, 2%, 4%, 10% 水溶液及びアスコルビン酸の 1%, 2%, 4%, 10% 水溶液を抽出溶媒として用いて, ポリフェノールの抽出量を比較した⁴⁾。シクロデキストリン水溶液を用いた抽出液は, ポリフェノール量を Folin-Denis 法で測定し, アスコルビン酸水溶液を用いた抽出液は, HPLC によりクロロゲン酸濃度を測定した。

2.8 和梨未熟果水抽出液の分析条件

2.8.1 有機酸分析条件

有機酸の分析には, HPLC を用いた。プロモチモールブルーで有機酸を選択的にラベル化するポストカラム法で分析を行った。分析条件は以下のとおり。カラム: Shodex RSpak KC (8.0mm I.D.×300mm, 昭和電工), ガードカラム: Shodex RSpak KC ガードカラム (6.0mm I.D.×50mm, 昭和電工), 流速: 0.5ml/min, 分析時間: 60min, カラムオープン温度: 50°C, 移動相: 3.0mM 過塩素酸, 反応液: 0.2mM プロモチモールブルー, 15mM リン酸水素二ナトリウム, 検出波長: 430nm

2.8.2 糖分析条件

糖の分析には, HPLC を用いた。蛍光誘導体化して検出を行うポストカラム法で分析を行った。分析条件は以下のとおり。カラム: Finepak GEL SA-121 6.0mm I.D.×100mm (日本分光), ガードカラム: Finepak GEL SA-121 ガードカラム (日本分光), 流速: 0.5ml/min, 分析時間: 80min, カラムオープン温度: 80°C, 反応温度: 165°C, 移動相: bufferA 250mM ホウ酸 (pH8.0), bufferB 600mM ホウ酸 (pH8.0), グラジエント条件: 0分 (A/B=100/0) → 5分 (A/B=100/0) → 22分 (A/B=60/40) → 34分 (A/B=60/40) → 36分 (A/B=0/100) → 58分 (A/B=0/100) → 58.1分 (A/B=100/0) → 80分 (A/B=100/0) 反応液: 100mM ホウ酸, 50mM グアニジン塩酸塩, 0.5mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム, 検出波長: Excitation 310nm, Emission 415nm

3 実験結果および考察

3.1 和梨のポリフェノール含有量

和梨は, 5月中旬と6月中旬に2回の摘果作業が行われる。この作業は養分の果実間競争を少なくし, 大きく品質の良い果実を生産するために必要な工程であるが, 発生する摘果未熟果は, 利用されことなく捨てられているため, 問題となっている。そこで, 和梨未熟果を機能性食品素材として利用する際の最適な採取時期を把握するため, 成長に伴う果実重量, 直径及びポリフェノール含有量の変化を測定した。

その結果, 果実の重量, 直径は, いずれも急激な増加はなく, 一定の割合で成長していることが分か

った(図1)。続いてこれらの水抽出液、熱水抽出液、80%エタノール抽出液を調製し、ポリフェノール含有量の測定を行った結果、成熟が進むにつれ単位重量あたりのポリフェノール含有量が減少していることが分かった。100gあたりのポリフェノール含有量が最も高かったのは5月24日に採取した未熟果の80%エタノール抽出液で、(+)-カテキン換算で590mg/100gF.W.であった。また、抽出溶媒による抽出効率率は全ての試料で同様の傾向が得られ、80%エタノール抽出の効率が最も良く、ついで熱水抽出、水抽出であった(図2)。一方、果実1個あたりのポリフェノール含有量では、成熟果の含有量が最も高いことが分かり、果実の成長に伴いポリフェノールが新たに合成されていると考えられる(図3)。さらに、成熟果について可食部と非可食部(皮、種)を分離し、それぞれポリフェノール含有量を測定した結果、非可食部のポリフェノール含有量が全体の約90%であり、一般的に食用とされる部位のポリフェノール含有量は低いことが分かった(図4)。

以上の結果より、和梨未熟果は、果実1個あたりのポリフェノール量は少ないが、高濃度で含有しているため、ポリフェノール抽出素材として利用価値が高いことが分かった。

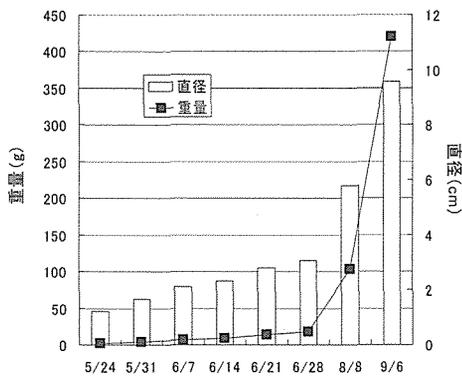


図1 和梨の成熟に伴う直径、重量変化

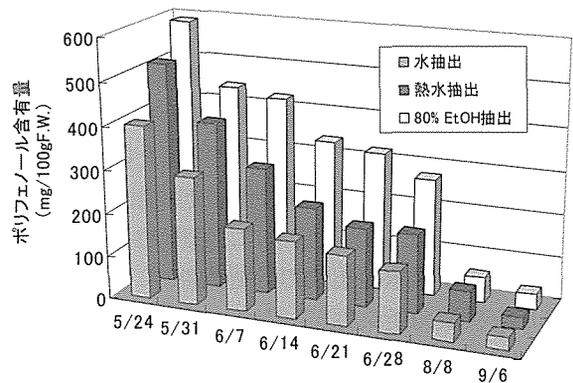


図2 和梨の成熟に伴う単位重量当たりのポリフェノール含有量変化

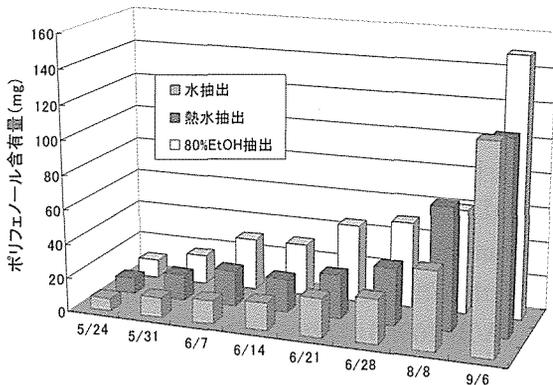


図3 和梨の成熟に伴う果実1個当たりのポリフェノール含有量変化

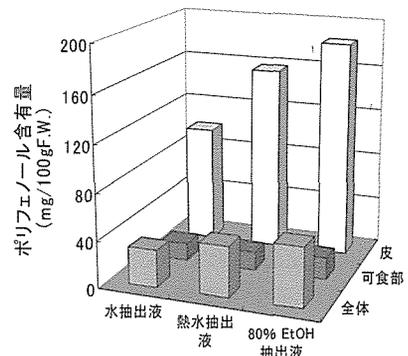


図4 成熟果の部位別ポリフェノール含有量

3.2 和梨水抽出液の生理活性

ポリフェノールは、様々な生理活性を持つことが知られている。その中で最も注目されている機能が抗酸化性である。そこで本研究では、6月14日に採取した和梨未熟果の水抽出液についてDPPH消去活性及びSOD様活性を測定した(表1)。

表1 和梨未熟果水抽出液の抗酸化活性

測定項目	試料	
	水抽出液	(+)-カテキン
DPPH ラジカル消去活性	50%阻害濃度 (mg/100ml)	3.6
	50%阻害濃度 (mg/100ml)	2.4
SOD 様活性	12.5	6.8
	SOD 様活性 (unit/100ml)	1190
		—

その結果、DPPH 消去活性の IC50 は、3.6mg/100ml で (+)-カテキンよりも高かった。一方、SOD 様活性は、1190unit/100ml であり、IC50 は 12.5mg/100ml となり、(+)-カテキンよりも高くなった。DPPH 消去活性、SOD 様活性いずれも IC50 が (+)-カテキンよりも高くなったことから、含有成分の活性は (+)-カテキンよりも低いと考えられる。

3.3 和梨ポリフェノールの推定

HPLC を用いて、ポリフェノール成分の推定を行った。成分の推定は、リテンションタイムの比較とコインジェクションによるピーク純度の変化をマルチチャンネル検出器により測定することにより行った。

その結果、コーヒーポリフェノールとして知られているクロロゲン酸が検出された (図5)。クロロゲン酸は、ラジカル消去作用や活性酸素消去作用を持つことが報告されており、和梨未熟果水抽出液の活性の中心成分と考えられる。また、クロロゲン酸は肝障害抑制作用などの生理活性も確認されており、和梨未熟果にも同様の効果が期待できる。

3.4 和梨ポリフェノール抽出条件の検討

和梨未熟果は、高濃度でポリフェノールを含有する有望な食品素材と考えられるが、実際に食品への利用を考えると、苦味や渋味、色調が問題となった。そこで、味と色調の改善を図るため、シクロデキストリン及びアスコルビン酸を添加した抽出溶媒を用いて、ポリフェノールの抽出試験を行った。

その結果、シクロデキストリンを 5%、10% 添加することで若干の褐変防止効果が認められたが、乳化作用による白濁が生ずるとともに粘度が高くなり、食品利用には課題が残った。また、抽出液のポリフェノール含有量を測定したが、シクロデキストリン添加量と抽出効率の相関は得られなかった (図6)。

一方、アスコルビン酸を添加した抽出溶媒では、薄い緑色の抽出液が得られ、褐変防止に大きな効果があることが分かった。また、1%水溶液と 10%水溶液でほぼ同等の結果が得られ、少量の添加でも十分な効果があることが分かった。続いて各抽出液のポリフェノール含有量を測定した。アスコルビン酸は Folin-Denis 法の妨害物質であるため、これらの抽出液は、HPLC によりクロロゲン酸濃度を測定し、アスコルビン酸添加効果を調査した。水抽出液のクロロゲン酸濃度は、150mg/100gF.W. であったが、アスコルビン酸添加抽出液では、290~350 mg/100gF.W. であり (図7)、アスコルビン酸によりクロロゲン酸の分解が抑制されたと考えられる。

この結果から、抽出液へのアスコルビン酸添加は、抽出液の色調保持、ポリフェノールの安定化に対し有効であることが分かった。

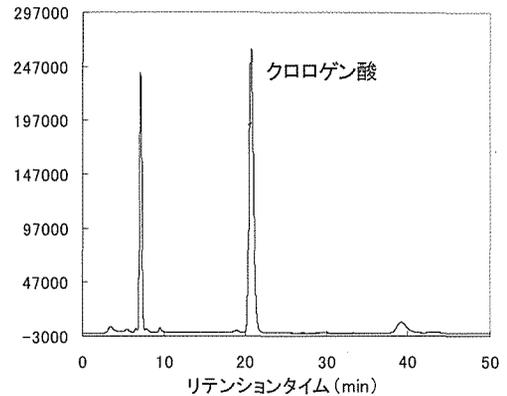


図5 和梨未熟果水抽出液のクロマトグラム

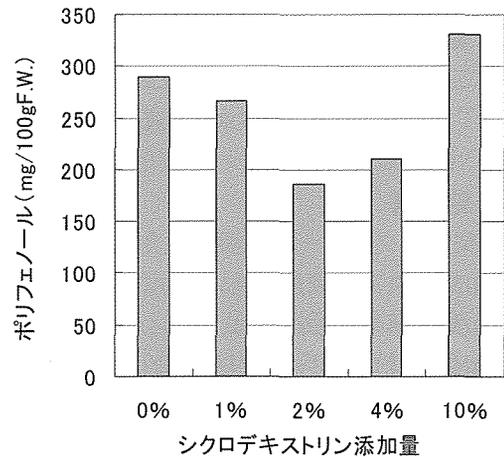


図6 シクロデキストリン添加によるポリフェノール抽出量の変化

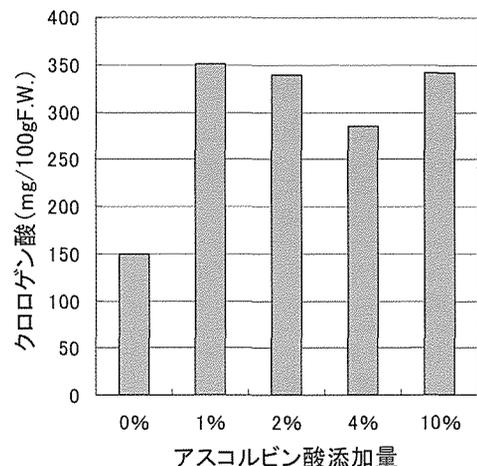


図7 アスコルビン酸添加によるクロロゲン酸抽出量の変化

3. 6 和梨未熟果の成分分析

和梨未熟果の有機酸や糖の組成、濃度を分析することにより使用可能な食品や使用した際の影響などを予想することが出来る。そこで HPLC を用いて水抽出液の有機酸及び糖の分析を行った。有機酸としてはリンゴ酸、クエン酸が検出されたが、酸味を呈するほどの濃度ではなかった (図 8)。また、還元糖としてマルトース、リボース、フルクトース、グルコース、そして糖アルコールのソルビトールが検出された (図 9)。抽出液の甘味を中心はソルビトールであると考えられる。また未同定ピークは、二糖、三糖または何らかの修飾を受けた単糖と考えられる。

このように和梨未熟果は甘味を呈する成分を多く含むことから、菓子、飲料等への利用が期待される。

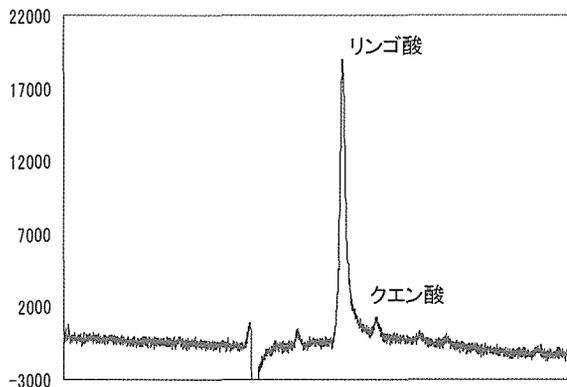


図 8 和梨未熟果水抽出液の有機酸分析

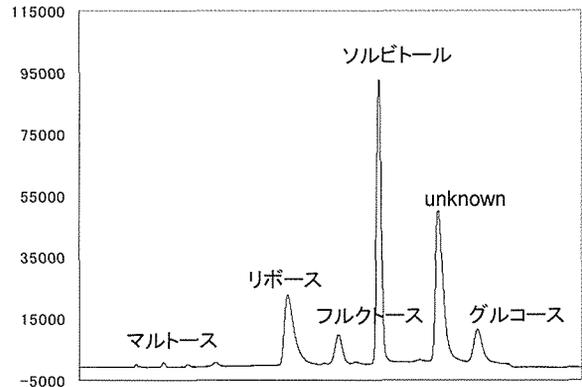


図 9 和梨未熟果水抽出液の糖分析

4 結 言

和梨ポリフェノールの機能性食品素材としての応用を検討した結果、以下の知見が得られた。

- 1) 和梨は果実の成長に伴い、単位重量あたりのポリフェノール含有量は減少する。
- 2) 和梨未熟果水抽出液は、ラジカル消去作用及び活性酸素消去作用を有する。
- 3) 和梨ポリフェノールの主成分はクロロゲン酸である。
- 4) 抽出溶媒へのアスコルビン酸の添加は、色素の安定化、クロロゲン酸の分解防止に有効である。
- 5) 和梨未熟果には有機酸としてリンゴ酸、クエン酸、還元糖としてマルトース、リボース、フルクトース、グルコース、糖アルコールとしてソルビトールが含まれている。

文 献

- 1) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一: 食品機能性研究法, 光琳 (2000) 218
- 2) 濱渦康範, 飯島悦子: 日本食品科学工学会誌, 46 (1999) 645
- 3) 金田尚志, 植田伸夫: 過酸化脂質実験法, 医歯薬出版 (1993) 144
- 4) 戸田不二緒, 上野昭彦: シクロデキストリン, 産業図書 (1995) 11