

県産桑における生理活性成分の含有量調査 (第2報)

徳島県立保健製薬環境センター (旧製薬指導所)

相原 文枝*¹・富士谷隆二郎・土橋 康裕*²

Physiologically active ingredient of mulberry produced in Tokushima prefecture (Ⅱ)

Fumie AIHARA, Ryuujiro FUJITANI and Yasuhiro TSUCHIHASHI

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

徳島県ではかつて養蚕に利用された桑園が残っており、現在、その多くが遊休桑園、荒廃桑園となっている。そこで、ルチン等の生理活性成分を含む県産桑の有効利用に向けて、平成21年度は、良質な原料の採集時期、部位について調査し報告を行った。

さらに、平成22年度は、桑葉の加工法について検討を行うため、熱風乾燥させた桑葉及び阿波晩茶由来乳酸菌で発酵させた桑葉の生理活性成分5成分の含有量について調査を実施したところ、加工法により各生理活性成分の含有量に違いがみられた。

Key words: 桑 mulberry, 生理活性成分 physiologically active ingredient

1-デオキシノジリマイシン 1-deoxynojirimycin, 4-アミノ酪酸 4-aminobutyric acid,
ルチン rutin, クエルセチン quercetin, ケンフェロール kaempferol

I はじめに

徳島県産桑を用いた健康福祉の向上、地場産業の育成等に向けた取り組みとして、平成21年度に部位別・産地別・採集時期別県産桑の生理活性成分5成分の含有量調査を実施し、良質な桑原料についての知見が得られた。

平成22年度は桑葉加工法について検討し、生理活性成分5成分の含有量を指標に熱風乾燥桑葉を基準として比較した。

II 調査項目

平成22年8月にB市で採集した桑葉について、熱風乾燥及び発酵を行い、平成21年度と同様に、5成分(1-デオキシノジリマイシン(以下DNJ)、4-アミノ酪酸(以下GABA)、ルチン、クエルセチン、ケンフェロール)の含有量を比較した。

III 試験方法

1 桑葉加工法

(1) 熱風乾燥桑葉

桑葉を裁断後、80℃2時間熱風乾燥した。

(2) 発酵桑葉

(1)に阿波晩茶由来乳酸菌1%懸濁液を添加し、空気を抜いて封をし、三菱ガス化学(株)製アネロパック5%と共にガスバリア袋に入れ密封後、30℃で7日間嫌気発酵させた。

その後漬込液を除き、40℃で2日間乾燥した。

2 乳酸菌の分離・同定

県内の阿波晩茶製造農家において、阿波晩茶漬込液及び木製樽中の茶葉の茹で汁を採取し、この中に含まれる乳酸菌を分離し、発酵試験に使用した。

乳酸菌は、栄研化学(株)製BCP加プレートカウント寒天培地(35~37℃72時間嫌気培養)にて得られたコロニーをカタラーゼ試験、グラム染色後、関東化学(株)製M.R.S寒天培地(37℃24時間嫌気培養)により分離培養した。同定は、シス

*¹現 徳島保健所 *²現 西部総合県民局保健福祉環境部

メックス・ビオメリュー(株)製アピ50CH+, アピ50CHL 培地により行った。

3 試料の定量分析

(1) 標準品及び試薬

標準品として、DNJ 生化学用, クエルセチン 2 水和物 化学用, ケンフェロール 化学用, GABA は和光純薬工業(株)製を, ルチン 3 水和物は東京化成工業(株)製を用いた。定量分析用溶媒は HPLC 用, その他の試薬は特級を用いた。

(2) 試料の調製法

① DNJ, GABA 定量用標準液及び試料

試料 0.5g に水/エタノール (1 : 1) 50mL を加え, 60 分間超音波処理後, 遠心分離 (4000rpm×10 分間) し, 上清を定容とした。これを Kim らの方法¹⁾ を参考とし, 次のとおり誘導体化した。

DNJ・GABA 混合標準溶液及び抽出した試料溶液 500 μ L に 0.4M ホウ酸・塩化カリウム緩衝液 (pH8.5) 500 μ L, 5 mM クロロ酢酸フルオレニルメチルのアセトニトリル溶液 1000 μ L を加え, 20 $^{\circ}$ C の恒温水槽中で 20 分間振とうする。この液に, 0.1M グリシン溶液 500 μ L, 0.1v/v% 酢酸 (17.5mM) 2.5mL を加えたものを分析用試料とした。

② ルチン定量用試料

試料 0.5g に水/エタノール (1 : 1) 50mL を加え, 60 分間超音波処理後, 遠心分離 (4000rpm×10 分間) し, 上清を定容とした。

③ クエルセチン, ケンフェロール定量用試料

分析用試料の調製は, Yang らの方法²⁾ により行った。

(3) 分析条件

① DNJ, GABA 分析条件

装置: 島津 LC-10AT, カラム: L-column2 ODS (4.6 ϕ ×250mm, 5 μ m), 移動相: 0.1% 酢酸: アセトニトリル: メタノール=70:30:0 (0 分) → 60:40:0 (30 分) → 0:0:100 (40-56 分), 流量: 1.0 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 検出波長: 254nm, 注入量: 20 μ L

② ルチン分析条件

装置: 島津 LC-10AT, カラム: L-column2 ODS (4.6 ϕ ×150mm, 5 μ m), 移動相: 0.4% クエン酸: アセトニトリル: 2-プロパノール=80:18:2, 流量: 1.0 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 検出波長: 370nm, 注入量: 10 μ L

③ クエルセチン, ケンフェロール分析条件

装置: 島津 LC-10AT, カラム: L-column2 ODS (4.6 ϕ ×150mm, 5 μ m), 移動相: 0.4% クエン酸: ア

セトニトリル: 2-プロパノール=70:27:3, 流量: 1.0 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 検出波長: 370nm, 注入量: 10 μ L

IV 結果及び考察

図 1~5 に定量結果を示した。各定量値 (n=3) は, 同一試料を 105 $^{\circ}$ C 5 時間で乾燥させた場合の重量換算を行っている。

これより, ルチン, クエルセチン, ケンフェロール, DNJ については, いずれも熱風乾燥桑葉において高く, 発酵過程で減少が認められた。特に, ルチンは発酵桑葉において定量下限値未満であったことから, 発酵過程で成分変化が生じたと考えられた。

しかしながら, GABA については, 発酵桑葉の方が約 1.5

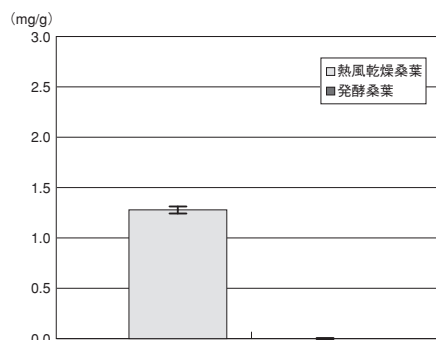


図 1 ルチン定量結果

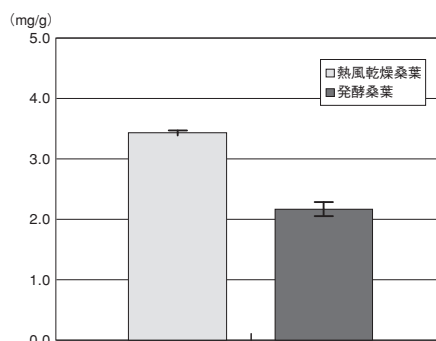


図 2 クエルセチン定量結果

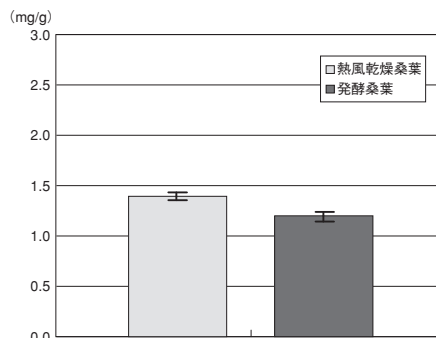


図 3 ケンフェロール定量結果

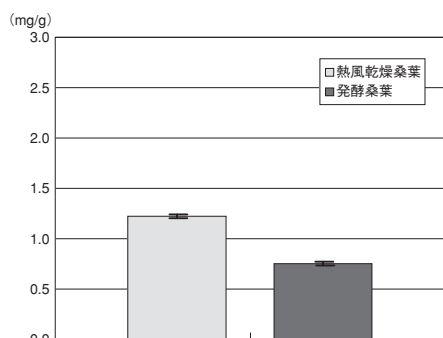


図4 DNJ 定量結果

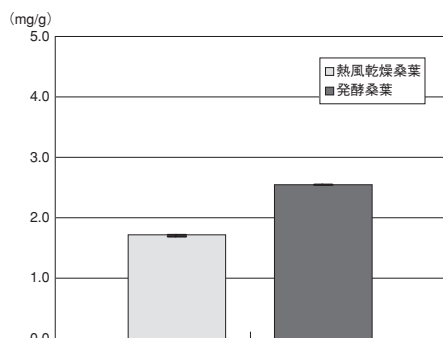


図5 GABA 定量結果

倍高いという結果が得られた。乳酸菌の中には、GABA 産生能の高いものが報告³⁾されていることから、この増加は乳酸菌の作用による可能性があると考えられた。

V まとめ

今回の調査では、熱風乾燥桑葉及び発酵桑葉について調査対象5成分の含有量を比較した。その結果、ルチン、クエルセチン、ケンフェロール、DNJについては熱風乾燥桑葉の方が高く、GABAは発酵させることにより含有量が約1.5倍に増加した。このことから、目的とする成分に応じて、加工方法を選択するとよいと示唆された。すなわち、ルチン、クエルセチン、ケンフェロール、DNJを利用する場合は熱風乾燥を、GABAを利用する場合は発酵させるとよいと考えられた。さらに、乳酸菌の選抜によりGABAを高含有する製品開発につながる可能性があると思われた。

VI 参考文献

- 1) Journal of Chromatography A 2003, 1002, 93-99
- 2) Asia Pac J Clin Nutr 2008, 17(s1), 275-279
- 3) 生物工学会誌, 2007, vol.85, No. 3, 109-114