

サルナシ (*Actinidia arguta*) 果皮の ポリフェノール含量と抗酸化成分

松坂 裕子

Total Polyphenol Content of Sarunashi (*Actinidia arguta*) Peel and Related Active Compounds

Yuuko MATSUSAKA

Abstract

The sarunashi berry is an edible fruit form a cultivar group of the *Actinidia* species. In this study, the total polyphenol content and antioxidant properties of its peel, seed and pulp were analyzed and compared with those of the kiwifruit, which is the most common commercially available cultivar group of this species.

Sarunashi peel showed the highest antioxidant potential on the basis of DPPH radical-scavenging assays. The main active constituents of the peel, as determined by HPLC were quercetin-3-galactoside and procyanidin B1, both of which showed high radical-scavenging activity. These two constituents may contribute to the antioxidant properties of sarunashi peel. Accordingly, it can be considered that the fruit may serve as a significant source of antioxidants.

1. はじめに

近年、野菜・果実の摂取が、生活習慣病をはじめとする多くの疾病あるいは老化の予防に有効であると示されている¹⁾。野菜や果実に含まれる抗酸化物質がそれらの予防に関与していると考えられ²⁾、植物性食品の研究が盛んに行われてきている³⁾。サルナシ (*Actinidia arguta*) は、マタタビ科に属し、別名コクワともよばれる。山中で普通にみられる落葉つる性木本、ナシに似た小果でサルが食用とするので、この名がある⁴⁾。皮ごと食することができ一般に甘酸の味が適度で食味に優れ、ビタミンCもキウイフルーツと同等あるいは、それ以上含まれるとの報告がある⁵⁾。果実酒やジュース、ジャムなどに加工利用されているが、その認知度は低い。マタタビ科の代表的な果実の

キウイフルーツは、別名中国サルナシともよばれるが、抗酸化性およびポリフェノール含量が高いと報告されている⁶⁾。また、キウイフルーツの摂取と健康との関連について、ヒトでの研究例もある⁷⁾。そこで、本研究では、サルナシの有効利用を目的に、サルナシの部位別（果肉部、果皮部、種子部）の抗酸化性およびポリフェノール含量を測定するとともに、抗酸化性に寄与している活性成分を明らかにすることとした。

2. 実験方法

1) 実験材料

札幌市内で入手した市販のサルナシを果肉部と果皮部および種子部に分け、それぞれ -50°C 、72時間凍結乾燥した。凍結乾燥サンプルはポリエチ

所属:

藤女子大学人間生活学部食物栄養学科

Department of Food Science and Human Nutrition, Faculty of Human Life Sciences, Fuji Women's University

レン製のフリーザーバッグ内、 -20°C の冷凍庫で保管した。比較のために、市販のキウイフルーツ（品種：ヘイワード）も同様に凍結乾燥した。

2) 試料の調製

凍結乾燥した各サンプルは使用直前にフードミル（Teskom：TML 1000）で30秒間粉碎後、電子天秤で0.1gを正確に秤量し、20 mLの50%および80%エタノールをそれぞれ加えて、 30°C の恒温槽で24時間抽出した。抽出後、No.4のろ紙でろ過後、ろ液を50%および80%エタノールでそれぞれ20 mLに定容した。この抽出液を適宜希釈し、DPPHラジカル消去活性およびポリフェノール含量を測定した。

3) DPPHラジカル消去活性と総ポリフェノール含量

DPPHラジカル消去活性の測定は福沢ら⁸⁾の方法に従った。すなわち、試料を添加したエタノール溶液2 mL、0.1 Mの酢酸緩衝液（pH5.5）2 mL、0.5 mMのDPPHエタノール溶液1 mLを混合した後、30分反応後、減少したDPPH量を日立分光光度計U-2001型を用いて517 nmの吸光度を測定した。試料溶液の代わりにエタノール溶液を加えたものをコントロールとして調製した。ラジカル消去活性（%）の算出は次の式に従った。

DPPHラジカル消去活性（%） $=100 - (\text{サンプルの吸光度} / \text{コントロールの吸光度} \times 100)$

予め標準物質のTroloxで検量線を作成して定量し、Trolox（ μmol /乾燥重量1g）量に換算して示した。測定はいずれも3反復行い、その平均値と標準偏差を示した。

総ポリフェノール含量は、Folin-Denis法⁹⁾で測定した。すなわち、一定濃度に希釈した試料溶液1 mLにFolin-Denis試薬（2倍希釈液）1 mLを加え混合し、3分後に10%炭酸ナトリウム溶液1 mL加えて混合し、1時間静置後、760 nmにおける吸光度を測定した。予め標準物質の没食子酸で検量線を作成して定量し、没食子酸量（mg/乾燥重量1g）に換算して示した。測定はいずれも3反復行い、その平均値と標準偏差を示した。

4) 薄層クロマトグラフィー（以下、TLC）分析

TLC分析は以下の条件で行った。

プレコート TLC板：Silica gel 60 F 254 0.25 mm or 0.5 mm厚（Merck）

スポットの検出にはフェノール試薬法およびバニリン-塩酸試薬法を用いた。

5) 高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC）分析

HPLC分析は以下の条件で行った。

カラム：Inertsil-PREP-ODS 6.0×250 mm、

移動相：①12%CH₃CN/0.1% TFA

②MeOH：H₂O：HCOOH=39：60：1

流速：1.0 mL/min

検出：UV 280 nm、370 nm

6) 抽出と分画

市販のサルナシ果皮30gを50%エタノールで2回抽出した。抽出液のエタノール溶液を減圧除去して得た抽出物（2.1g）に、酢酸エチルと水を加えて振盪することによって酢酸エチル画分（0.3g）を得た。

7) 酢酸エチル可溶性画分の活性物質の分離

サルナシ果皮の酢酸エチル可溶性画分（0.3g）をゲル汙過カラムクロマトグラフィー（Sephadex LH 20、 ϕ 3×35 cm）に供し、メタノールで15 mLずつ分画した。分画後、TLC（溶媒：クロロホルム：メタノール：ギ酸=12：5：1）に供して、スポットのパターンより、Fr.1~14をまとめてSP 1、Fr.15~27をまとめてSP 2、Fr.28~31をまとめてSP 3、32~37をまとめてSP 4、Fr.38~50をまとめてSP 5とした。次に、このSP 1~5の画分のDPPHラジカル消去活性を測定した。

3. 結果と考察

1) DPPHラジカル消去活性と総ポリフェノール含量

サルナシの3部位（果肉部、果皮部、種子部）の50%および80%エタノール抽出液のDPPHラジカル消去活性試験とポリフェノール含量の結果をそれぞれFig. 1およびFig. 2に示した。比較のためにキウイフルーツの結果も示した。抽出に用いる溶媒に関して、植物性食品のポリフェノー

ルの抽出には、温度条件よりも溶媒条件の影響が大きいとの報告がある¹⁰⁾。そこで、今回は、一般に植物性食品のポリフェノール抽出に多く用いられている80%エタノール溶媒抽出と比較のために50%エタノール溶媒でも行った。その結果、ラジカル消去活性は、サルナシ果皮部 (SP) の50%エタノール抽出で $670 \mu\text{mol/g DW}$ と極めて高く、80%エタノール抽出の約2.5倍の活性となった。同様に、ポリフェノール含量も50%エタノール抽

出のサルナシ果皮部 (SP) で 35 mg/g DW となり、80%エタノール抽出の 17 mg/g DW に比べて2倍以上の値を示した。部位別の比較でも果肉 (SF) および種子部 (SS) に比べて、果皮部 (SP) でポリフェノール含量が多く、また、キウイフルーツと比較してもサルナシ果皮部で顕著に高くなった。分析したサルナシおよびキウイフルーツのDPPHラジカル消去活性とポリフェノール含量の関係は、相関係数 0.9864 となり、高い正の相関が認められた。

従って、今後の抽出は50%エタノールを用い、抗酸化性は、DPPHラジカル消去活性を指標に活性成分の探索を行うこととする。

2) 活性物質の探索

カラムクロマトグラフィーで分画後、TLC分析のスポットのパターンよりまとめたSP1~SP5画分のDPPHラジカル消去活性を測定した (Fig. 3)。その結果、標準物質のコーヒー酸と比べて、SP4およびSP5が高いラジカル消去活性を示したので、両者を分析した。

初めにSP4画分を逆相HPLC (移動相②、UV 370 nm) に供した (Fig. 4)。その結果、保持時間 (t_R) 23.72分に単一のピークが得られた。標

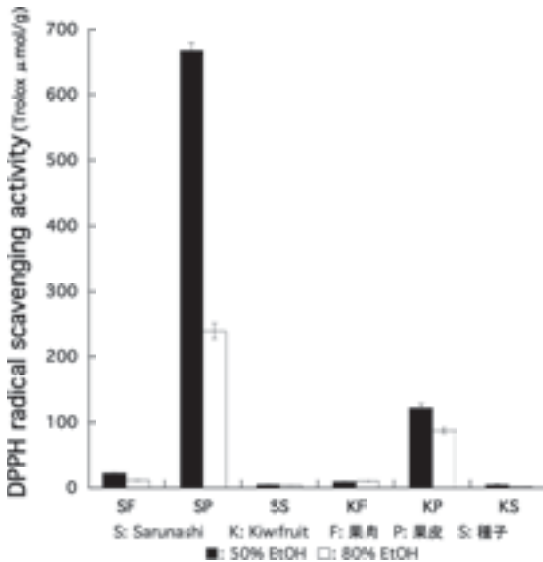


Fig. 1 DPPH radical scavenging activity.

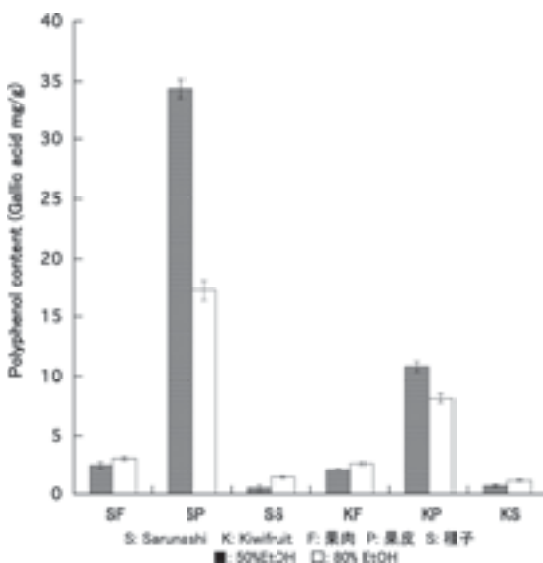


Fig. 2 Total polyphenol content.

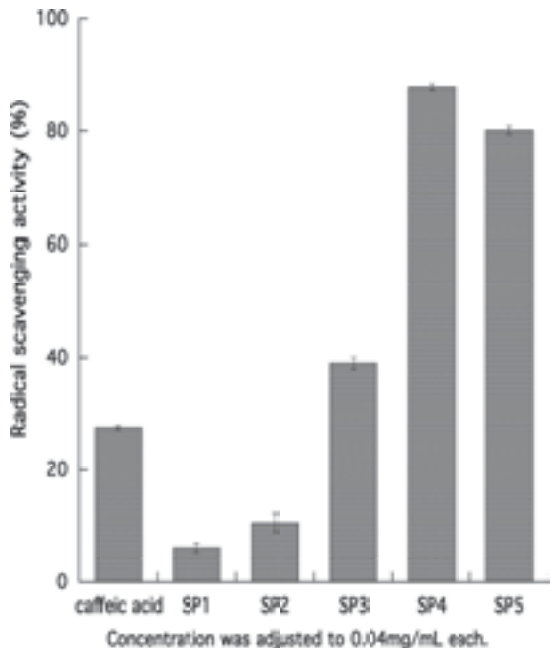


Fig. 3 DPPH radical scavenging activity.



Fig. 4 HPLC profile of SP4.

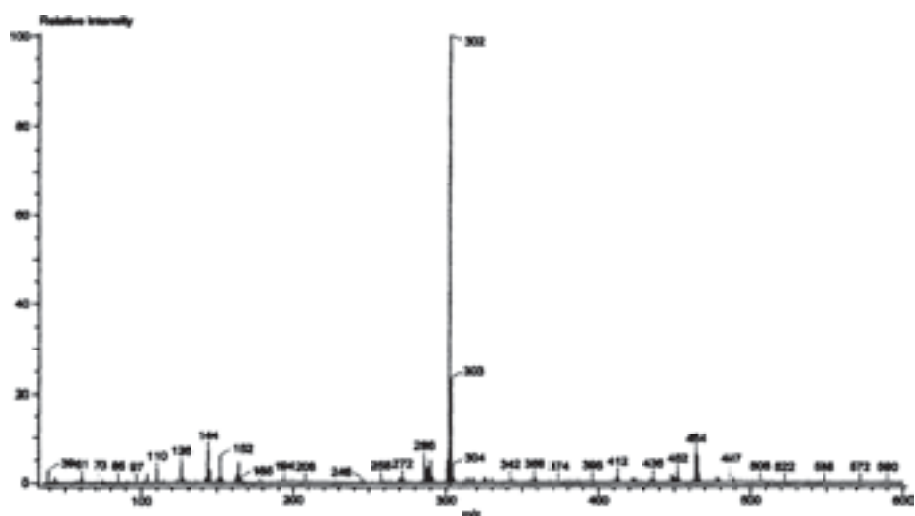


Fig. 5 FD-mass spectrum of SP4.

準物質との比較により活性物質として、ケルセチン配糖体が考えられたため、単離した。単離化合物は質量分析(FD-MS)に供した。そのFD-massのスペクトルをFig. 5に示した。m/z 302のイオンピークは、ケルセチンの分子量を示し、m/z 464のイオンピークは、ケルセチンに糖が結合した配糖体の分子量を示している。この2つのピーク、標準物質のHPLC保持時間(t_R)および既知の $^1\text{H-NMR}$ のデータとの一致により活性物質としてケルセチン配糖体のケルセチン-3-ガラクトシド(別名：ヘパリン)と同定した。

次に、SP 5画分を同様に逆相HPLC(移動相①、UV 280 nm)に供した。その結果、保持時間(t_R) 11.35分のピークを(-)-エピカテキンと(+)-カテキンの二量体のプロシアニジン B 1と同定した(Fig. 6)。

サルナシ果皮酢酸エチル画分に存在するケルセチン-3-ガラクトシドおよびプロシアニジン B 1は既知の化合物であるが、コーヒー酸よりも高いDPPHラジカル消去活性を有するので、サルナシ果皮の抗酸化性に寄与していることが示唆された。

近年、プロシアニジン類の持つ生理機能性は注目されている¹¹⁾。また、ケルセチン-3-ガラクトシドは、りんごやかきの果皮にも存在しており、抗酸化性などが報告されている^{12,13)}。ケルセチンに結合する糖の種類によって生体内利用性は異なるものの、生理機能性などが今後期待される。サルナシ果皮には、プロシアニジン B 1およびケルセチン-3-ガラクトシドが含まれており、一般に果皮は食することができるので、生食はもちろん食品加工でもサルナシ果皮を有効に利用すべきと考

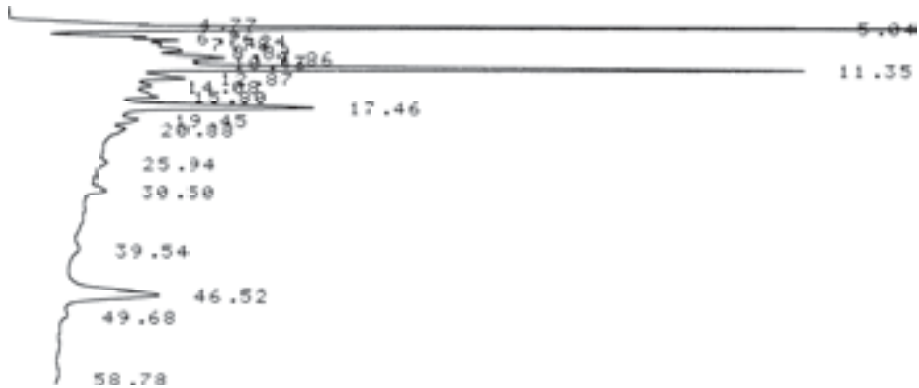


Fig. 6 HPLC profile of SP5.

えられる。

4. 要約

マタタビ科に属するサルナシの3部位（果肉部、果皮部および種子部）のDPPHラジカル消去活性およびポリフェノール含量を測定し、抗酸化性の高かった果皮部に含まれる抗酸化成分（ラジカル消去活性物質）の探索を行った。

- 1) マタタビ科のサルナシの3部位（果肉部、果皮部、種子部）の抗酸化性の比較では、果皮部で極めて高いDPPHラジカル消去活性およびポリフェノール含量を示した。
- 2) 果皮部の50%エタノール抽出物の酢酸エチル可溶性画分に高いラジカル消去活性がみられた。酢酸エチル可溶性画分より、逆相HPLCにより、活性物質として、ケルセチン-3-ガラクトシドおよびプロシアニジンB1を同定した。両者はコーヒー酸よりも高いDPPHラジカル消去活性を有するので、サルナシ果皮の抗酸化性に寄与していることが示唆された。

5. 謝辞

本論文をまとめるにあたり、御助言を頂きました、北海道大学大学院農学研究院の川端 潤教授に心から感謝いたします

参考文献

- 1) Steinmetz, K. A., and Potter, J. D., Vegetables, fruit and cancer prevention: A review. *J. Am. Diet Assoc.*, 96, 1027-1039. (1996).
- 2) Ellingsen, I., Hjerkin, E. M., Seljeflot, I., Arnesen, H., and Tonstad, S., Consumption of fruit and berries is inversely associated with carotid atherosclerosis in elderly men. *Br. J. Nutr.*, 99, 674-681 (2008).
- 3) Sun, J., Chu, Y-F., Wu, X., and Liu, R. H., Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7449-7454 (2002).
- 4) 堀田 満 (代), 世界有用食物事典, 平凡社, pp. 44 (1989).
- 5) 西山一郎, ベビーキウイ (サルナシ) 果実の特性, 日本家政学会誌, 61, 501-504 (2010).
- 6) Weenen, H., Koolhaas, W. E., and Apriyantono, A., Identification and assessment of antioxidant capacity of phytochemicals from kiwifruit. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4148-4155 (2009).
- 7) Hunter, D. C., Skinner, M. A., Wolber, F. M., Booth, C. L., Loh, J. M. S., Wohlers, M., Stevenson, L. M., and Kruger, M. C., Consumption of gold kiwifruit reduces severity and duration of selected upper respiratory tract infection symptoms and increases plasma vitamin C concentration in healthy older adults. *Br. J. Nutr.*, 108, 1235-1245 (2012).
- 8) 福澤健治, 寺尾純二, 脂質過酸化実験法, 廣川書店, pp.79-80 (1990).
- 9) Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M-S., and Nakayama, T., Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 373-377 (2002).
- 10) Dorta, E., Lobo, M. G., and Gonzalez, M.,

Reutilization of mango byproducts: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *J. Food Sci.*, 77, C80-C88 (2012).

- 11) 有賀敏明, 細山浩, 徳武昌一, 山越純, プロアントシアニジンの機能性解明と開発, 日本農芸化学会誌, 74, 1-8 (2000).
- 12) Oleszek, K. W., Lee, C. Y., Jaworski, A. W., and Price, K. R., Identification of some

phenolic compounds in apples. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 430-432 (1988).

- 13) Ohguchi, K., Itoh, T., Akao, Y., Nozawa, Y., Ito, M., Nakajima, C., Oyama, M., and Iinuma, M., Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* 'Fuyu') on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm Bull.*, 33, 122-124 (2010).