

採取時期によるキツピの 成分変動

1. キツピについて
2. キツピの抗酸化作用
3. キツピの成分分析
4. 抗酸化作用と3成分との
関連性について
5. 遺伝子解析と成熟果実について

1. キツピについて

基原 (Non-JPS2015) :

Citrus tachibana Tanaka,

Citrus leiocarpa Tanaka,

Citrus grandis Osbeck (Rutaceae)

又は *Citrus unshiu* Marcowicz,

Citrus reticulata Blanco (Rutaceae) の

成熟した果皮



1. キツピについて

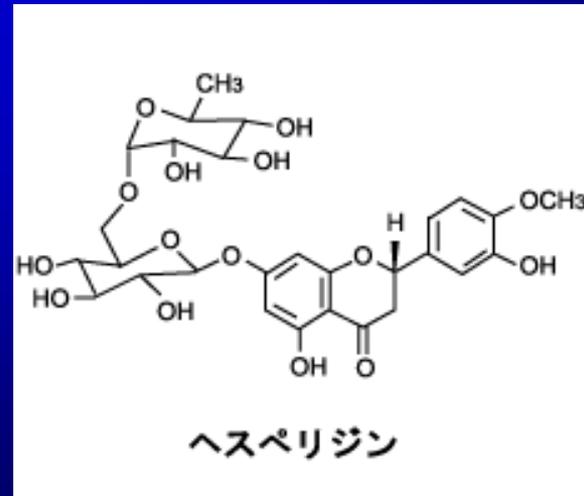
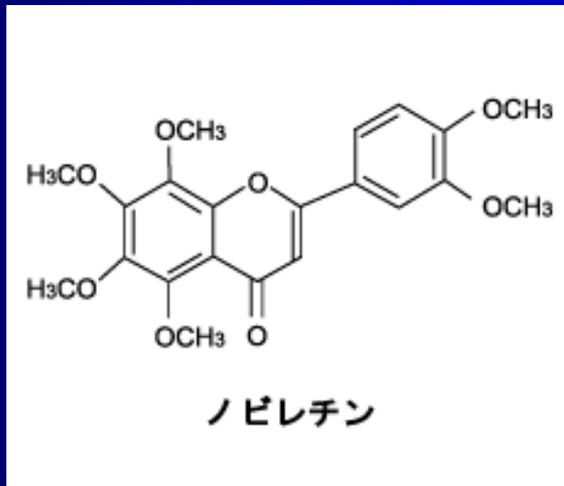
適用：漢方処方薬として

鶏鳴散加茯苓，釣藤散などに配合



1. キツピについて（成分）

カロチノイドの β -クリプトキサン、ノビレチン、ヘスペリジンなどのフラボノイドの他、トリテルペン系のリモニンなどが含まれる。ノビレチンは抗認知症作用、ヘスペリジンは抗炎症作用などが報告されている。



1. キツピについて

漢方のメッカ推進プロジェクト

歴史的背景を生かした商品の開発・製造

付加価値のある薬用植物の栽培

- 採取場所並びに採取時期による抗酸化作用及び3成分の変動
- 抗酸化作用と3成分との関連
- 遺伝的解析と成熟果実について



2. キツピの抗酸化作用

1) 実験材料

2) エキス試料の調製

3) 測定方法 (SOD様活性)

4) 測定結果



採取場所

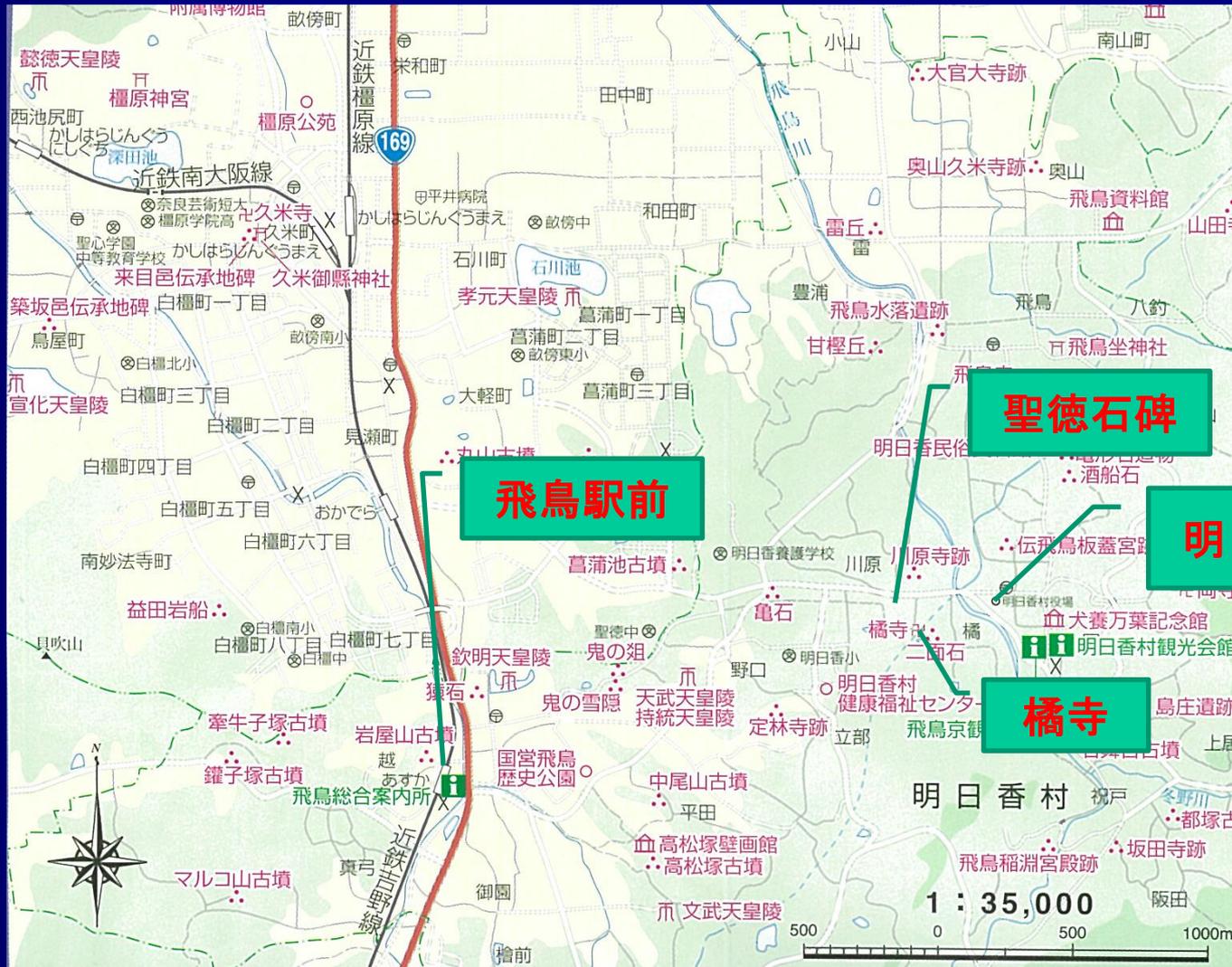


表 試験検体

サンプル記号	採取場所	採取年月	採取 個数	乾燥後重量 (g)	調製, 保管等条件
C t A O - 1 4 1 0	奈良県明日香村 (村役場) ※明日香村役場	2014年10月	7	3.33	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存
C t A O - 1 4 1 1		2014年11月	8	6.69	
C t A O - 1 4 1 2		2014年12月	8	7.36	
C t A O - 1 5 0 1		2015年 1月	8	8.85	
C t A O - 1 5 0 2		2015年 2月	8	8.20	
C t S M - 1 4 1 0	奈良県明日香村 (聖徳太子生誕地 の石碑) ※聖徳石碑	2014年10月	9	3.74	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存
C t S M - 1 4 1 1		2014年11月	10	6.97	
C t S M - 1 4 1 2		2014年12月	8	5.17	
C t S M - 1 5 0 1		2015年 1月	9	7.08	
C t S M - 1 5 0 2		2015年 2月	8	6.41	
C t T K - 1 4 1 0	奈良県明日香村 (橘寺 南側の巨 木) ※橘寺巨木	2014年10月	7	2.71	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存
C t T K - 1 4 1 1		2014年11月	8	5.83	
C t T K - 1 4 1 2		2014年12月	8	5.27	
C t T K - 1 5 0 1		2015年 1月	8	7.47	
C t T K - 1 5 0 2		2015年 2月	11	7.25	
C t A S - 1 4 1 0	奈良県明日香村 (近鉄飛鳥駅) ※飛鳥駅前	2014年10月	5	2.33	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存
C t A S - 1 4 1 1		2014年11月	5	2.45	
C t A S - 1 4 1 2		2014年12月	5	3.47	
C t A S - 1 5 0 1		2015年 1月	7	4.03	
C t A S - 1 5 0 2		2015年 2月	7	4.37	



2-2) エキス試料の調製

試料約0.5gを精密に量り，エタノール(99.5)150 mLを加え，還流冷却器を付けて80°C水浴中で5時間加熱し，冷後，ろ過する．その後，ろ液はエバポレーターを用いて溶媒を留去したものをエキス試料とした．

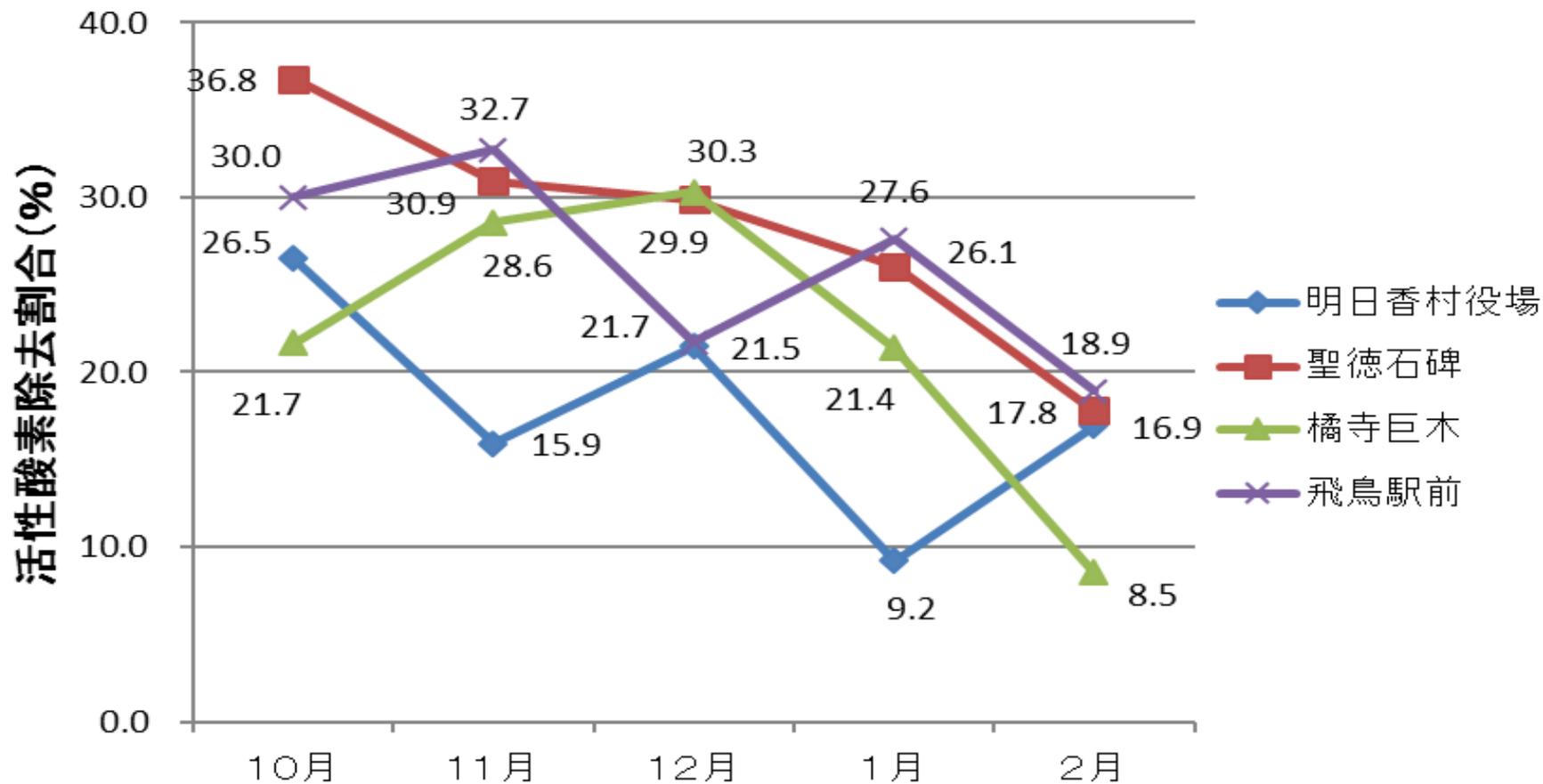


2-3) 測定方法 (SOD様活性)

SOD様活性は、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ反応系を用いて測定した。
1mMキサンチン溶液, 1Mトリス塩酸緩衝液,
1mM EDTA溶液, 0.75mMニトロブルーテトラゾリウム(NBT)溶液, 2-2で調製したエキス試料の混合液に, 1U/mLキサンチンオキシダーゼ溶液(MERCK社製)を添加して37°Cでインキュベートした後, 吸光度(560nm)を測定した。

2-4) 測定結果

SOD様活性



3. キツピの成分分析

1) 実験材料・乾燥減量

2) ノビレチン・ヘスペリジン
ポリフェノールの 定量法

3) 定量結果



3-1) 実験材料・乾燥減量

実験材料

2-1と同様の実験材料を用いた.

乾燥減量

試料は, 日本薬局方生薬試験法乾燥減量の項に準じて乾燥減量を算出した. ただし, 試料の量は, 元の試験検体採取量に応じた適当量とし, 乾燥条件は, 日本薬局方外生薬規格2015に従い105°Cで6時間とした.



2)ノビレチンの定量法 ①

試料約0.167 gを精密に量り、エタノール(99.5)50 mLを加え、還流冷却器を付けて80°C水浴中で5時間加熱し、冷後、ろ過する。残留物をエタノール(99.5)で洗浄し、ろ液及び洗液を合わせ、エタノール(99.5)を加えて正確に50 mLとする。この液 1 mLを正確に量り、エタノール(99.5)を加えて正確に20 mLとし、試料溶液とする。別に、ノビレチン合成品(和光純薬工業(株))をデシケーター(シリカゲル)で24時間乾燥し、その約5mgを精密に量り、エタノール(99.5)に溶かし、正確に50 mLとする。この液 1 mLを正確に量り、エタノール(99.5)を加えて正確に100mLとし、標準溶液とする。



2)ノビレチンの定量法 ②

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：333 nm）

カラム：内径4.6 mm，長さ15 cmのステンレス管に
5 μ mの液体クロマトグラフィー用オクタデ
シルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：35 $^{\circ}$ C付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル(3:2)

流 量：ノビレチンの保持時間を約15分に調整

2)ヘスペリジンの定量法 ①

試料約0.167 gを精密に量り，エタノール(99.5)50mLを加え，還流冷却器を付けて80°C水浴中で5時間加熱し，冷後，ろ過する．残留物をエタノール(99.5)で洗浄し，ろ液及び洗液を合わせ，エタノール(99.5)を加えて正確に50 mLとする．この液 5 mLを正確に量り，水を加えて正確に10 mLとし，試料溶液とする．別に，定量用ヘスペリジンをデシケーター(シリカゲル)で24時間以上乾燥し，その約10mgを精密に量り，メタノールに溶かし，正確に100 mLとする．この液 5 mLを正確に量り，水を加えて正確に10 mLとし，標準溶液とする．



2)ヘスペリジンの定量法 ②

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：285 nm）

カラム：内径4.6 mm, 長さ15 cmのステンレス管に
5 μ mの液体クロマトグラフィー用オクタデ
シルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：40 $^{\circ}$ C付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル／酢酸(100)混液
(82:18:1)

流 量：ヘスペリジンの保持時間を約15分に調整



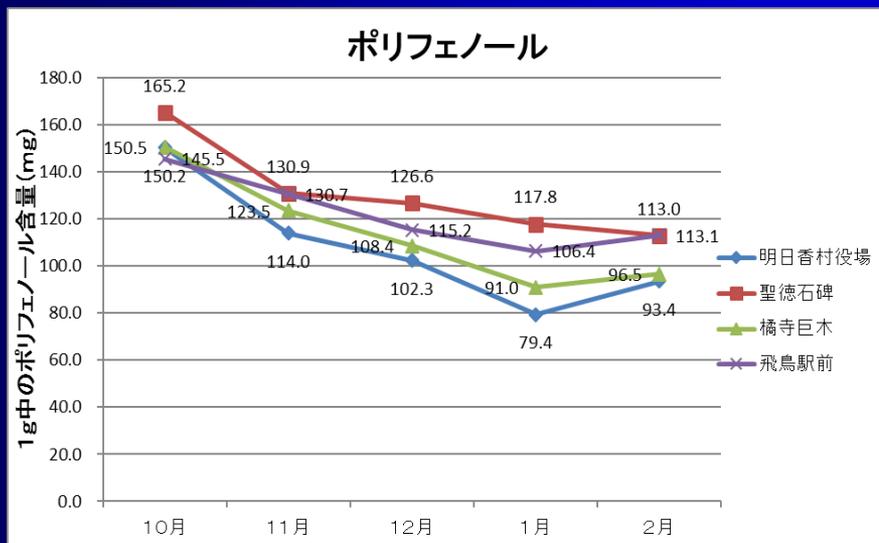
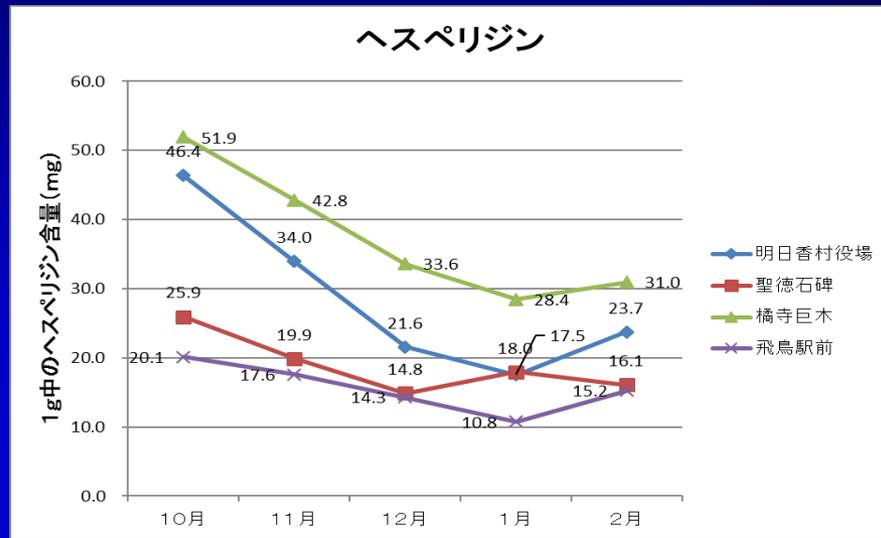
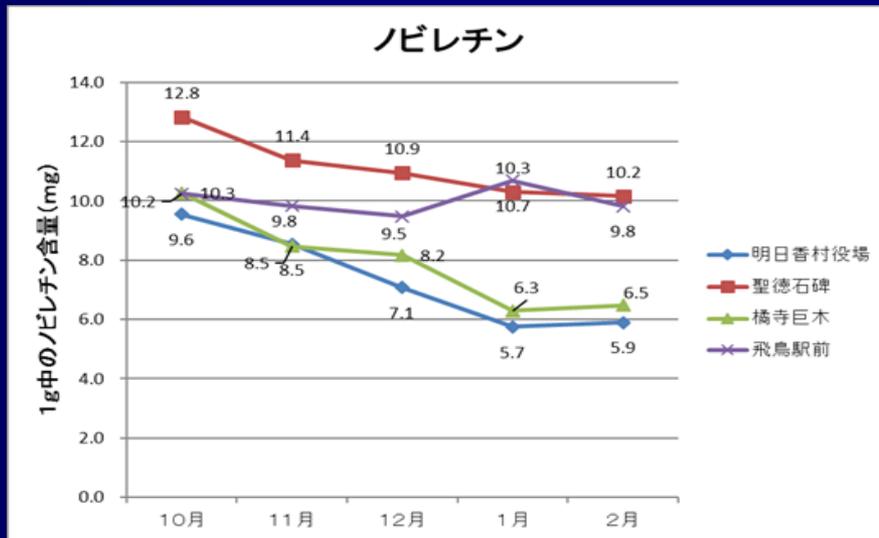
2)ポリフェノールの定量法

総ポリフェノール量の定量は、フォリン・チオカルト法を用いて測定した。

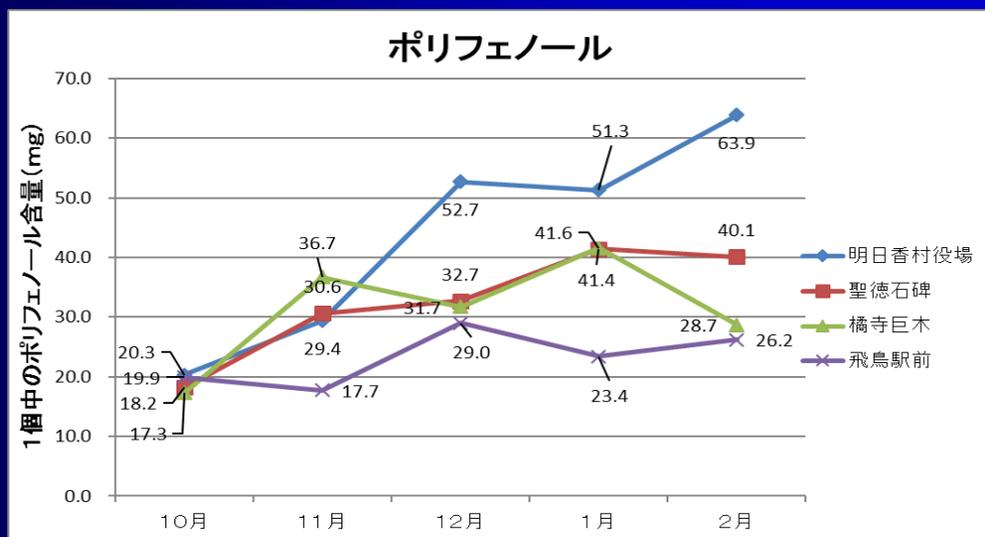
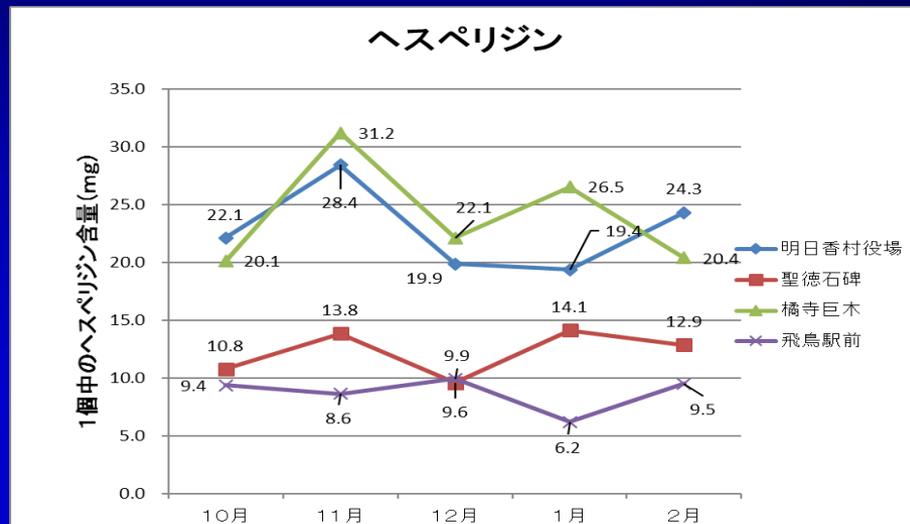
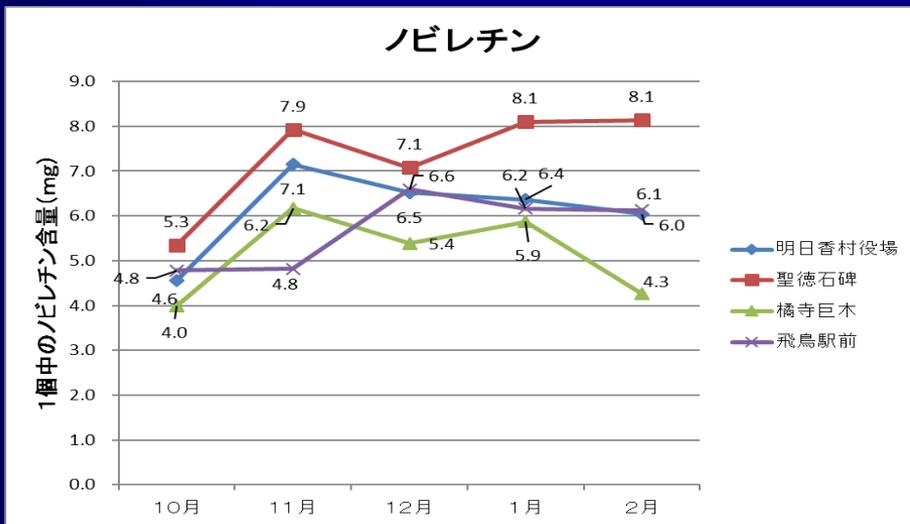
フォリン・チオカルト試薬 (MP biomedical社製) と2-2で調製したエキス試料, 0.4M炭酸ナトリウム水溶液を混合し, 50°Cでインキュベートし吸光度 (765nm)を測定した。検量線は没食子酸一水和物 (和光純薬工業(株))を使用し, サンプルに含まれるポリフェノール量を没食子酸一水和物相当量として, エクス試料1g当たりのポリフェノール量を算出した。



3) 定量結果 (1g中の3成分の含量)



3) 定量結果 (果実1個当たりの3成分の含量)



1. キツピについて
2. キツピの抗酸化作用
3. キツピの成分分析
4. 抗酸化作用と3成分との
関連性について
5. 遺伝子解析と成熟果実について

4 抗酸化作用と3成分との関連性

抗酸化作用との相関係数

ノビレチン	:0.717
ヘスペリジン	:-0.018
ポリフェノール	:0.697

ノビレチンとポリフェノールに

有意な相関関係 ($p < 0.05$)



5. 遺伝子解析と成熟果実について

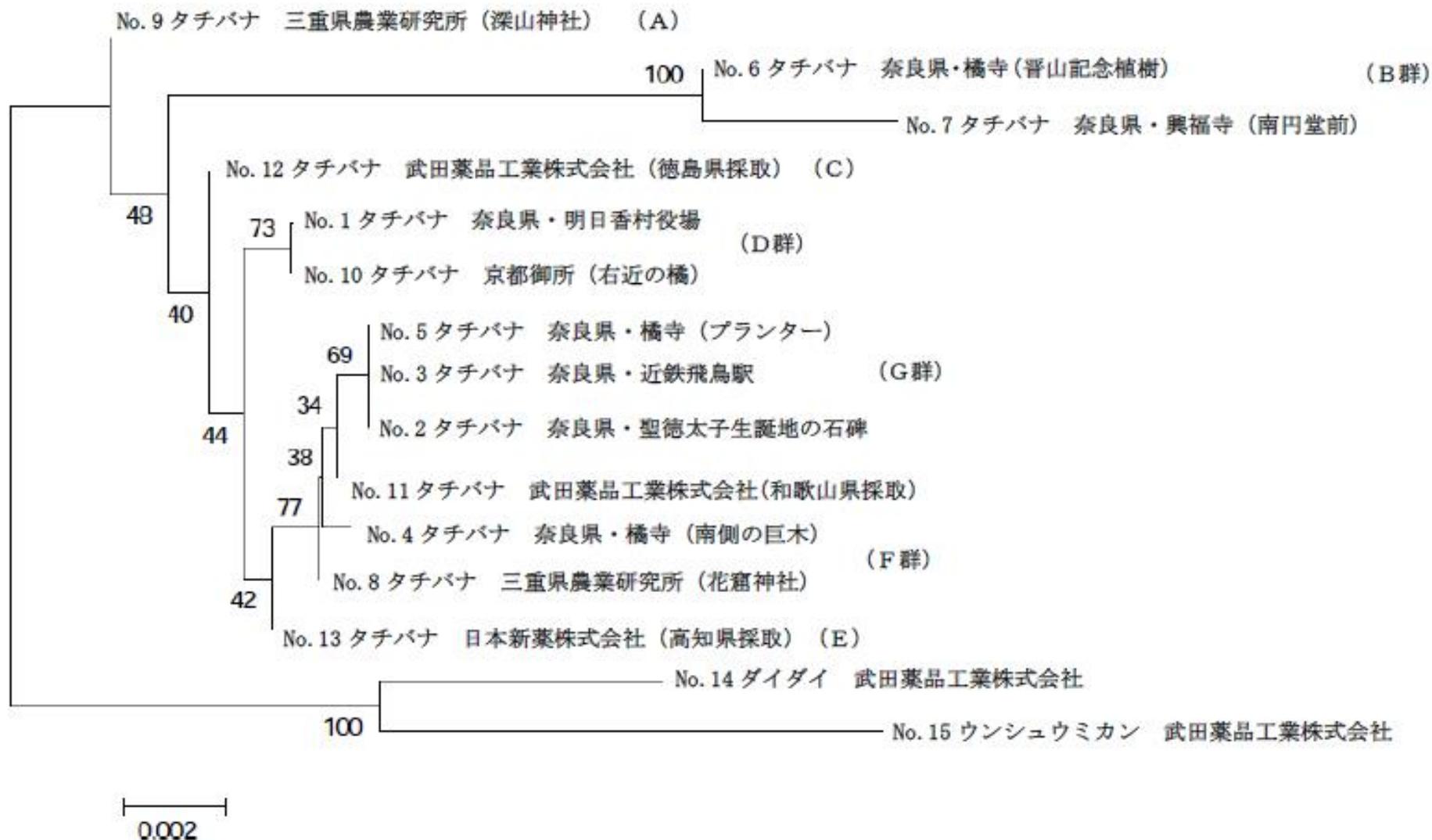
1) 実験材料

2) 試験検体の外部形態

3) ノビレチン・ヘスペリジンの
定量方法

4) 定量結果

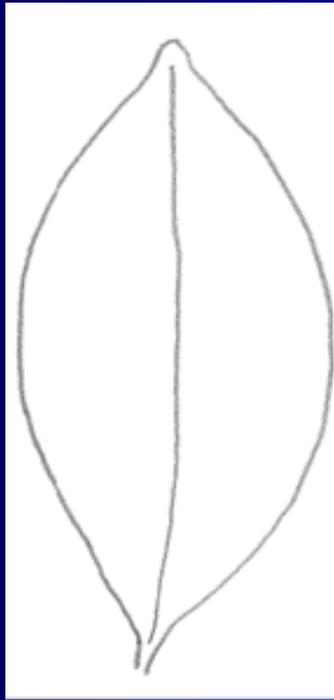




系統樹解析

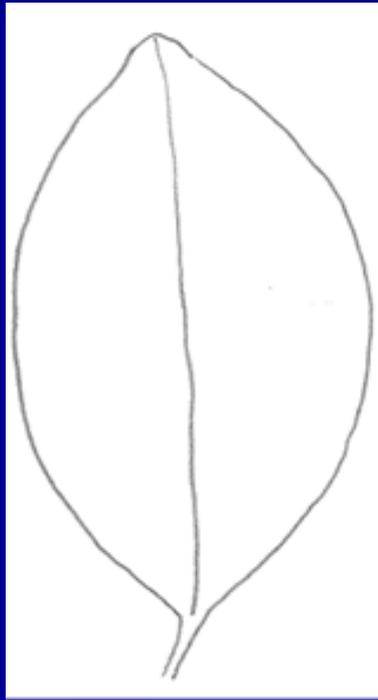


葉の形状



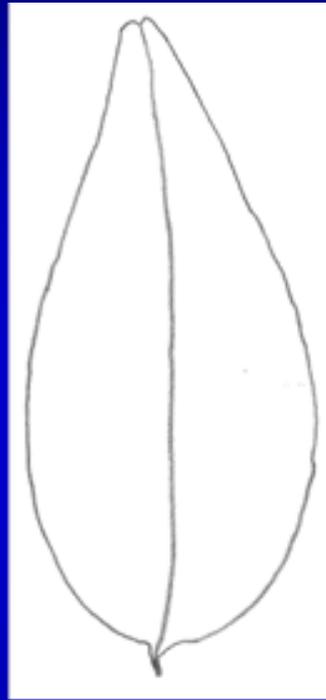
No,7

興福寺



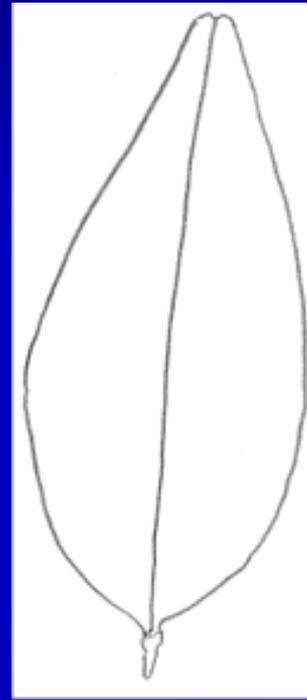
No,6

橘寺
晋山



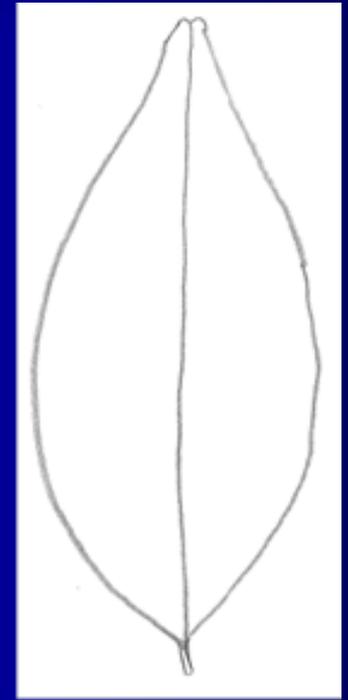
No,1

明日香
村役場



No,2

聖徳
石碑



No,4

橘寺
巨木



表 試験検体

サンプル記号	採取場所	採取年月	調製, 保管等条件	葉の形状
C t K T - 1 6 0 1	奈良県奈良市 (興福寺 南円堂前)	2016年 1月	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存	楕円形 先端が凸型
	※興福寺			
C t T S - 1 6 0 1	奈良県明日香村 (橘寺 晋山記念植樹)	2016年 1月	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存	楕円形 先端が凸型
	※橘寺晋山			
C t A O - 1 6 0 1	奈良県明日香村 (村役場)	2016年 1月	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存	卵円形 先端が凹型
	※明日香村役場			
C t S M - 1 6 0 1	奈良県明日香村 (聖徳太子生誕地の石碑)	2016年 1月	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存	卵円形 先端が凹型
	※聖徳石碑			
C t T K - 1 6 0 1	奈良県明日香村 (橘寺 南側の巨木)	2016年 1月	30℃で100時間温風乾燥 後, 室温保存	卵円形 先端が凹型
	※橘寺巨木			



5-2) 試験検体の外部形態



興福寺



橘寺晋山



明日香村役場



聖徳石碑

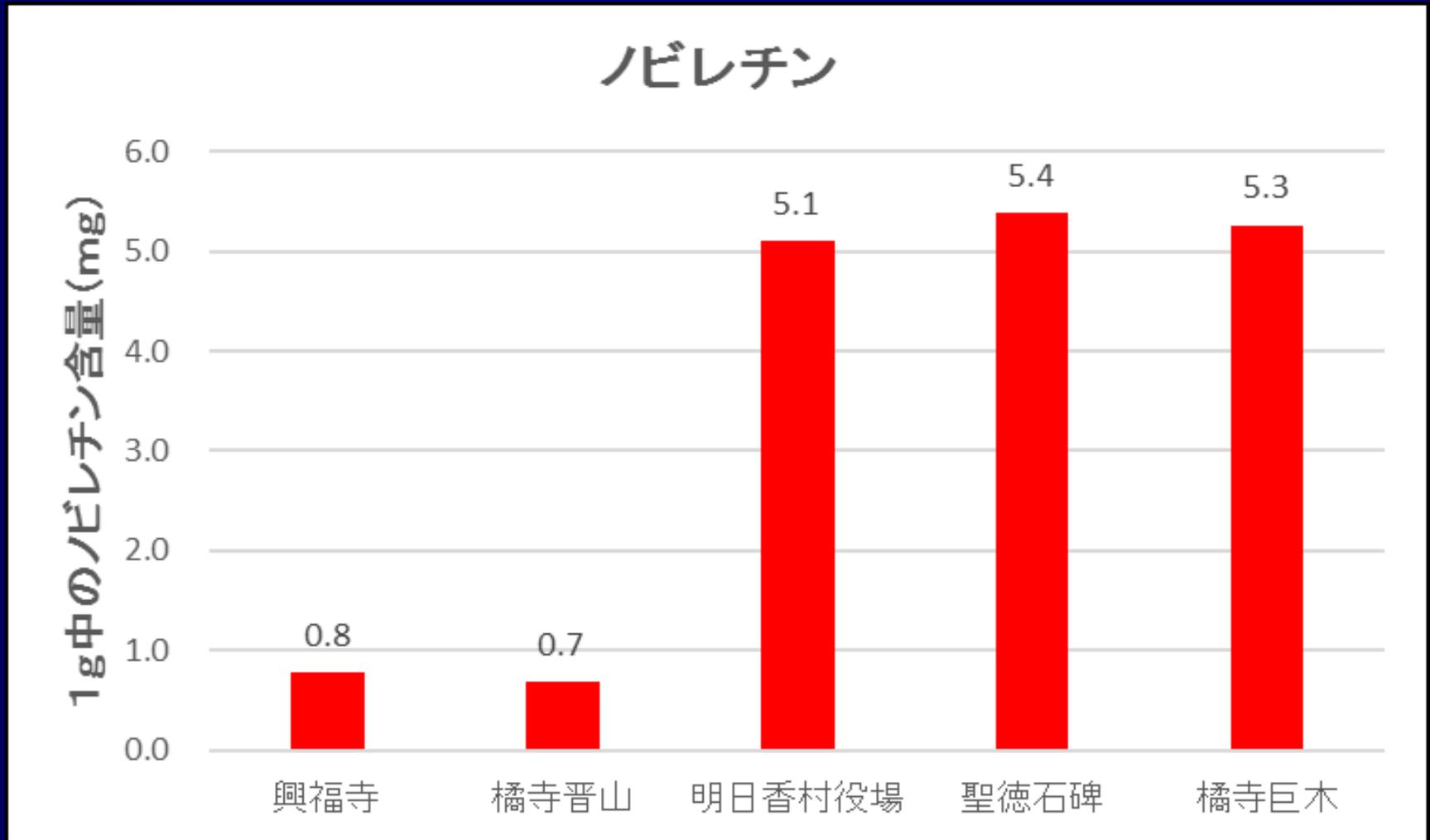


橘寺巨木

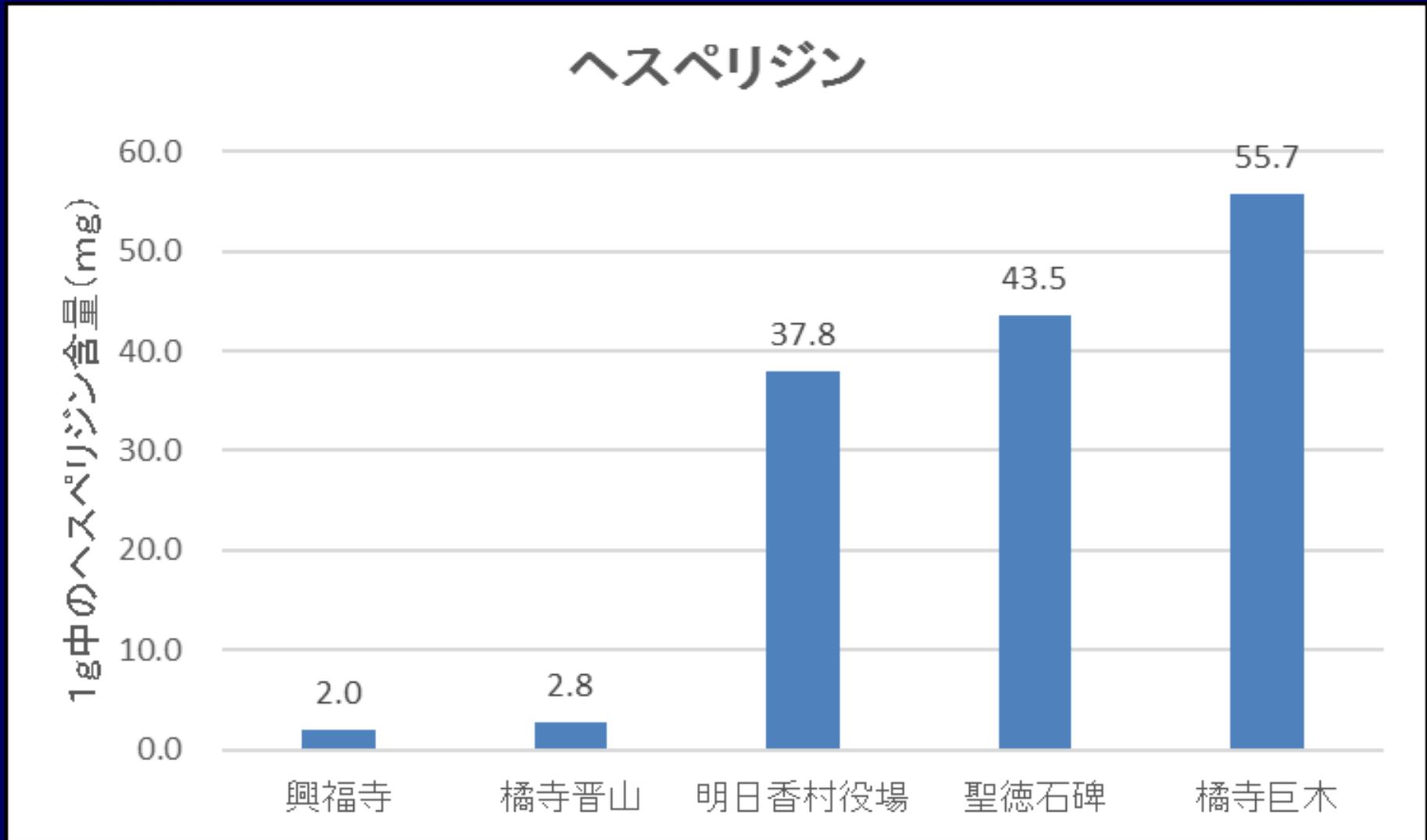
5. 遺伝子解析と成熟果実について

- 1) 実験材料
- 2) 試験検体の外部形態
- 3) ノビレチン・ヘスペリジンの
定量方法
- 4) 定量結果

5-4) 定量結果 ノビレチン



5-4) 定量結果 ヘスペリジン



謝辞

本研究にあたり、今回の試験検体
をご恵与いただきました、
明日香村役場、興福寺、橘寺
のみなさまに感謝いたします。



ご清聴ありがとうございました

