

クズ茎中のイソフラボノイド

清水浩美^{*1)}、都築正男^{*1)}、松澤一幸^{*1)}

Isoflavonoids in the Stalk of *Pueraria lobata* Ohwi

SHIMIZU Hiromi^{*1)}, TSUDUKI Masao^{*1)} and MATSUZAWA Kazuyuki^{*1)}

Kudzu(*Pueraria lobata* Ohwi) is legumes, and it contains the isoflavonoids as well as the soybean. At present, the development of the foods which is useful for the osteoporosis prevention using the stalk of the kudzu as Nara Prefecture Collaboration of Regional Entities for the Advancement of Technological Excellence, JST is advanced in Nara Prefecture. As part of the program, the isoflavonoids were extracted from the stalk of kudzu, and the isoflavonoid contents in the extract were analyzed. The result showed that it got 9.4% extract and about 20% in the extract is the isoflavonoids.

1. 緒言

クズは、マメ科のつる性多年生草本であり、毎年春に新芽が出、茎は1年で数メートル以上伸長するが、越年した部分は木化し、太いものでは5センチ径になるものもある。

根は、葛根湯などの生薬として使用されるとともに、そこから取れる良質のデンプンが高級食材として、利用されてきた。しかし、繁殖力の強さから地上部は、迷惑植物とも言われている。

現在、奈良県では、地域結集型研究開発プログラムとして「古都奈良の新世紀植物機能活用技術の開発」の事業展開を平成18年1月より実施しており、この事業では、クズに含まれているイソフラボノイドが持つ機能性、特に骨粗鬆症予防効果に注目し産学官連携し、研究を進めている。クズを利用するにあたり、根は医薬品としての使用に限定されている(デンプンとしての利用を除く)ため、駆除されているクズの茎を有効利用し、茎から抽出したイソフラボノイドを食品に添加することで、広く県民の健康増進に寄与することが本事業の目的である。

当センターでは、クズ茎からイソフラボノイドの効率的な抽出方法、イソフラボノイドの分析方法、食品の試作等を検討しており、本報では抽出に関し現在までに得られた知見を報告する。

2. 実験方法

2.1 クズの前処理並びに抽出方法

抽出方法はFig.1に示したとおりである。

2.1.1 クズ茎の粉碎

クズ茎は、近畿大学構内において2年以上生育したと考えられる多年生の茎を11月に採取し、水洗、乾燥したものをを用いた。

多年生のクズ茎は、前述のとおり木化しており、乾燥工程を経ないと粉碎することが難しい。今回は、森林技術センター所有のシュレッダーで、茎を圧砕し、その後、園芸用はさみでオガ粉製造機に投入できる長さに切断した後、オガ粉製造機に50μmのふるいを装着し、粉末にした。

2.1.2 抽出溶媒

食品に添加し、ヒトが喫食できる溶媒を使用することが条件となってくるため、食品添加物として使用できる溶媒のうち、抽出後の濃縮、衛生管理を考慮し、エタノールを選択した。

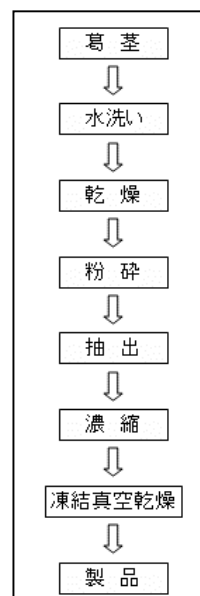


Fig.1 Flow chart of extraction

2.1.3 抽出条件

クズの粉末を(株)品川工業所製、加圧減圧攪拌試験機に入れ、室温、常圧下でエタノール99.5%にて二昼夜以上

*1) 食品・毛皮革技術チーム

攪拌抽出した。

攪拌停止後、一昼夜程度静置後、上清をくみ出し、ろ紙 No.2 を使用し、常圧ろ過にて残渣と分離し、抽出液とした。液比は抽出機器の容量上、約 3 から 5 倍程度で実施し、抽出効率を向上させるため、5 回抽出を行った。

2.1.4 抽出後の処理方法

抽出液を 35 にて減圧濃縮し、乾固したものをイオン交換水で懸濁させ、凍結真空乾燥機で粉末状に加工し、抽出量等を求めた。

2.2 抽出物の成分分析

凍結真空乾燥した抽出物中のイソフラボノイドの分析方法は以下のとおりである。

2.2.1 イソフラボノイド標準物質

イソフラボノイドは、以下に示す標準品 1mg を 10ml のメタノール（高速液体クロマトグラフ用 和光純薬工業(株)製）に溶解（100ppm 溶液）、それを各 100 μ l ずつ混合した物（各標準品濃度 7.1ppm）を使用した¹⁾。

分析に用いた標準物質は、プエラリン（LKT Laboratories 社製 純度 99.0%）・ダイジン・ゲニステイン・グリシチン・ゲニステイン・グリシチン（以上、和光純薬工業(株)製 純度 98.0%）・ダイゼイン（Calbiochem 社製 純度 99.0%）・マロニルダイジン・マロニルゲニステイン・マロニルグリシチン・アセチルダイジン・アセチルゲニステイン・アセチルグリシチン（以上、ナカライテスク(株)社製 純度 90.0%）・フォルモノネチン（LKT Laboratories 社製 純度 90.50%）の計 14 種類である。

2.2.2 HPLC 分析条件

（株）島津製作所製 LCMS - 2010EV を用いてイソフラボノイドの分析を行った。カラムは、Waters 社 SymmetryC18 3.5 μ m (2.1 \times 150mm) を使用した。試料は 1 μ l 注入し、オープンは 40、流速 0.25ml/min で溶離液を流し、検出は 260nm の UV で行った。溶離液は A : 0.1% ギ酸入アセトニトリル 10% 溶液、B : 0.1% ギ酸入アセトニトリル 35% 溶液を用い、以下の条件でグラジェントをかけた。0min 30min ; A:B = 100:0 50:50、30min 40min ; A:B = 50:50 45:55、40min 65min ; A:B = 45:55 0:100、65.01min 75min ; A:B = 100:0

超純水、ギ酸、アセトニトリルともに、和光純薬工業(株)製で、ギ酸は悪臭物質試験用を用い、超純水とアセトニトリルは、LC/MS 用を使用した。

定量は、クロマトグラムのピーク面積から作成した絶対検量法を採用した。

抽出物は、10mg をメタノール 10ml に溶解し、ろ過後試験に供した。

一般に、イソフラボノイドは、構造上、糖と結合したグリコシド型と糖のないアグリコン型に分かれ、通常、体内では糖が切り離されアグリコン型で吸収されると言われている²⁾。今回、分析対象としたイソフラボノイドでは、ダ

イゼイン、グリシチン、ゲニステイン、フォルモノネチンがアグリコン型であり、その他はグリコシド型である。そこで、グリコシド型に関しては、分子量からアグリコン換算した値の合計値を出した。ただし、プエラリンは、糖が C-C 結合で存在することから、アグリコンとして算出した。

3. 結果及び考察

3.1 クズ茎からイソフラボノイドの抽出

3.1.1 クズ茎の性状

粉末の粒度分布を測定したところ、モード径 46.32 μ m、メディアン径 44.09 μ m、平均値 40.14 μ m であった。

クズ茎の粉碎時に、オガ粉製造機の砥石部分に焦げ付きなどが生じたことから、糖質、精油成分の存在が推察される。

3.1.2 抽出結果

抽出結果は Table 1 に示したとおりである。5 回抽出のうち、初回は、乾燥茎が溶媒を吸収したため、回収された溶媒が少なかった。また、50 μ m という微粉碎の粉末を利用したため、ろ過工程に時間を費やした。濃縮後、真空凍結乾燥機で乾燥する際に、水に対する溶解度が想定していたよりも低く、懸濁状態で実施した。

最終的に、5 回抽出の結果、総抽出量は、571.3g で、抽出率がクズ茎に対して 9.4% であった。今後、工業的に抽出物を調製するにあたり、さらに詳細な抽出条件の検討が必要である。

Table 1 Result of extraction from stalk of kudzu

	1st	2nd	3rd	4th	5th
Kudzu Stalk (Kg)	4	6.1	6.1	6.1	6.1
Ethanol (L)	20	22	20	20	20
Extraction time(h)	40	49	25	39	70
Extraction weight(g)	158.5	171.8	105.8	71.4	63.8
Extraction rate (%)	4.0	2.8	1.7	1.2	1.1

3.2 抽出物中のイソフラボノイド含有量

クロマトグラムは Fig. 2 に、抽出物中のイソフラボノイドの含有量は Table 2 に、成分比は Fig. 3 に示した。

抽出物の含有イソフラボノイドの主成分は、クズに特有のプエラリンが約半量を占めていた。次いで大豆に含有するダイジン、6'-O-マロニルダイジンなどが含まれることが判明した。ダイゼインと並んで大豆に多いとされているゲニステイン及びその配糖体は、クズには少量しか含まれていなかった。

分析した 14 種のイソフラボノイド量の合計は抽出物中

に約 20%で、それをアグリコン換算すると 16%となった。これは、原体のクズ茎あたりに換算すると約 2%の総イソフラボノイドになる。

今後、抽出方法を検討する際に今回の結果と比較し、主成分であるプエラリンの含有量に着目する必要がある。

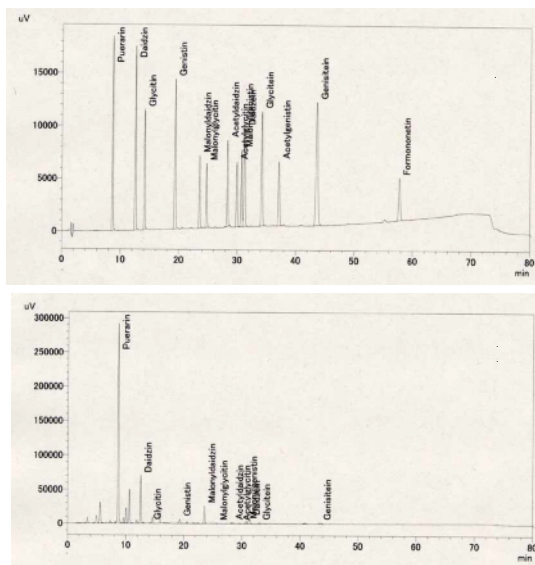


Fig.2 HPLC chromatogram of isoflavonoids
Standard (A), Sample (B)

Table 2 The isoflavonoid contents in the extract

Puerarin	10.12
Daidzin	3.58
Glycitin	0.08
Genistin	0.28
6'' -O-Malonyldaidzin	2.52
6'' -O-Malonylglycitin	0.00
6'' -O-Acetyldaidzin	1.27
6'' -O-Acetylglycitin	0.49
6'' -O-Malonylgenistin	0.35
Daidzein	0.92
Glycitein	0.03
6'' -O-Acetylgenistin	0.04
Genistein	0.03
Formononetin	0.00
Total aglycon	16.00
Total isoflavonoid	19.73

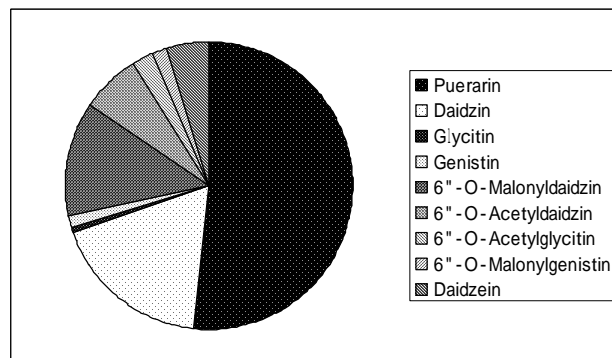


Fig.3 The component ratio of isoflavonoids in the extract

4. 結言

本研究では、クズの多年生茎から 99.5%エタノールでイソフラボノイドを抽出し、食品等への加工に容易な乾燥粉末を調製した。

クズの多年生茎からは、9.4%のエタノール抽出物が得られた。抽出物中のイソフラボノイド含有量は約 20%で、そのうち半量がクズに特有の成分であるプエラリンであった。

今後、抽出方法の条件を詳細に検討し、最も効率的にイソフラボノイドが抽出できる抽出方法を決定するとともに、調製した抽出物の耐熱性、耐酸性について試験を行い、抽出物を添加した食品を試作していく予定である。

謝辞

本研究にあたり、奈良県地域結集型研究開発プログラムに参画する近畿大学農学部応用生命化学科 河村教授をはじめ、コア研究室研究員諸氏に深謝いたします。

なお、本研究は、独立行政法人 科学技術振興機構、奈良県地域結集型研究開発プログラム、古都奈良の世紀植物機能活用技術の開発事業の成果によるものである。

参考文献

- 1) 分析担当研究者 織田 肇, 厚生科学研究補助金(生活安全総合研究事業)協力研究報告書: LC/MS による食品及び生体試料中の植物エストロゲンの分析 1998
- 2) 食品安全委員会 新開発食品専門調査会, 大豆イソフラボンを含む特定保健用食品安全性評価の基本的な考え方 2006年5月