

クズ蔓中のイソフラボノイド(第2報)

清水浩美^{*1)}, 松澤一幸^{*1)}

Isoflavonoids in the Stalk of *Pueraria lobata* Ohwi(The Second Report)

SHIMIZU Hiromi^{*1)} and MATSUZAWA Kazuyuki^{*1)}

前報¹⁾では、クズ蔓中のイソフラボノイドの抽出および含有量について明らかにしたが、今後の企業化を見据え、本研究ではクズ蔓からのイソフラボノイドの効率的な抽出方法について調査した。クズ蔓の処理方法について、粉碎方法、溶媒および温度条件などを検討した結果、微粉碎したクズ蔓を原料とし、50%エタノールによる20℃抽出処理の抽出率が高くなり、クズ蔓原体あたりのイソフラボノイド含有量も最も高くなることが明らかとなった。また、抽出物のイソフラボノイド純度は、99.5%エタノールによる抽出が最も高くなることがわかった。また、クズの部位別のイソフラボノイド含有量を分析した結果、葛根には原体あたり蔓の5倍程度のイソフラボノイドが含有しており、葉、花、種子にはイソフラボノイド含有量が比較的低いことが判明した。

1. 緒言

クズはマメ科のつる性多年生草本であり、その根は葛根湯などの生薬として使用されるとともに、それから取れる良質のデンプンは高級食材であり、「吉野葛」は奈良県の特産品としての知名度が高い。

現在、奈良県では、平成18年1月より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」の事業展開を産学官共同で実施しており、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、研究を進めている。クズを利用する場合、デンプン以外の根の成分は医薬品としての使用に限定されているが、蔓などその他の部位はほとんど有効利用されていない。

そこで、蔓に着目し、蔓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を目的として、効率的な抽出方法並びにクズの部位別イソフラボノイド含有量について検討した。

2. 実験方法

2.1 抽出条件の検討

2.1.1 クズ蔓の前処理並びに抽出方法

クズ蔓は、近畿大学構内において2年以上生育したと思われる多年生の蔓を11月に採取し、水洗、乾燥したものをを用いた。これを細かく粉碎したもの(以下、微砕クズ蔓と呼ぶ)とチップーシュレッダーで粗く処理したもの(以下、粗砕クズ蔓と呼ぶ)を抽出実験に供した。食品に添加する目的で抽出物を調製する場合、使用する溶媒がエタノールでは、製造費用が高価になり、一般的な食品への添加が難しくな

る。そこで本研究では実用化に即した、蒸留水、30%エタノール、50%エタノールを使用した。また、前報との比較のために95%・99.5%エタノールについても使用した。

抽出方法は、微砕クズ1g、粗砕クズ10gを秤量し、それぞれ25倍量の溶媒を添加し、20℃、40℃の恒温槽中で振とう、24時間抽出した後、ろ過した。また、熱水抽出は、微砕クズ1g、粗砕クズ10gに、それぞれ25倍量の蒸留水を添加し、ホットプレート上で30分間加熱した後、ろ過した。抽出液は濃縮後、凍結真空乾燥処理し、残渣を精秤して抽出率を求めた。

2.1.2 イソフラボノイド分析方法

凍結真空乾燥した抽出物10mgに、メタノール10mlを加えて溶解し、そのろ液を試験に供した。

分析条件は、表1のとおりである。

表1 分析条件

LC/MS	:(株)島津製作所	LCMS-2010EV
Column	: Waters社	SymmetryC18 3.5 μm (2.1×150mm)
Eluent	: gradient	
Flow rate	: 0.25ml/min	
Oven temp	: 40℃	
Injection size	: 1 μl	
Detector	: UV260nm	
溶離液	A : 0.1%ギ酸入超純水	
	B : 0.1%ギ酸入アセトニトリル	
グラジエント条件		
	A:B=90:10→77.5:22.5	(0min→30min)
	A:B=77.5:22.5→76.25:23.75	(30min→40min)
	A:B=76.25:23.75→65:35	(40min→65min)
	A:B=90:10	(65.01min→75min)

*1) 食品・毛皮革技術チーム

2.2 クズの部位別イソフラボノイドの分布

2.2.1 クズの前処理並びに抽出方法

葛根は市販品の生薬原料を、蔓は、2.1 で使用したものを、葉・花は、高原農業振興センターで採取したものを、種子は高原農業振興センターでの保管品を使用した。いずれの試料も乾燥後粉碎したものを1~5g 使用し、5倍量の99.5%エタノールおよび50%エタノールを用いて48時間振とう抽出し、ろ過した。残渣に同量の溶媒を再度添加し、抽出を5回繰り返し、抽出液はそれぞれ、濃縮後、凍結真空乾燥処理し、抽出率を求めた。

2.2.2 イソフラボノイド分析方法

凍結真空乾燥した抽出物10mgに、メタノール10mlを加えて溶解し、そのろ液を試験に供した。分析条件は、前述と同様である。

3. 結果及び考察

3.1 抽出条件の検討結果

抽出に用いたクズ蔓を図1に示した。それぞれの水分含有量は、微砕クズ蔓が6.6%、粗砕クズ蔓が7.7%であった。

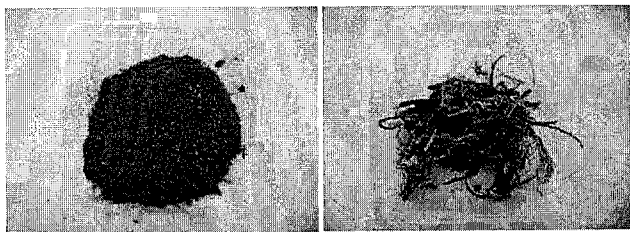


図1 微砕クズ蔓 粗砕クズ蔓

3.1.1 抽出率

抽出率の結果を表2、表3および図2に示した。すべての溶媒において、微砕クズ蔓の方が粗砕クズ蔓より抽出率が高かった。また、温度について、水では微砕クズ蔓・粗砕クズ蔓とも20℃の方が抽出率が高く、エタノール系では、40℃に加温したものの方が抽出率が高くなる傾向が認められた。また、エタノールについて、95%と99.5%を比較すると、水が混入している95%の方が抽出効率が高くなる傾向が認められる。一方、熱水については微砕クズ蔓の抽出率が最も高い値を示した。

表2 微砕クズ蔓の抽出率結果

微砕	水	30%	50%	95%	99.5%
20℃	16.5	17.5	17.6	7.5	4.9
40℃	16.0	18.0	18.0	9.2	6.4
熱水	19.1				

表3 粗砕クズ蔓の抽出率結果

粗砕	水	30%	50%	95%	99.5%
20℃	12.1	13.9	13.9	3.4	2.5
40℃	11.4	15.5	16.2	6.0	3.9
熱水	12.6				

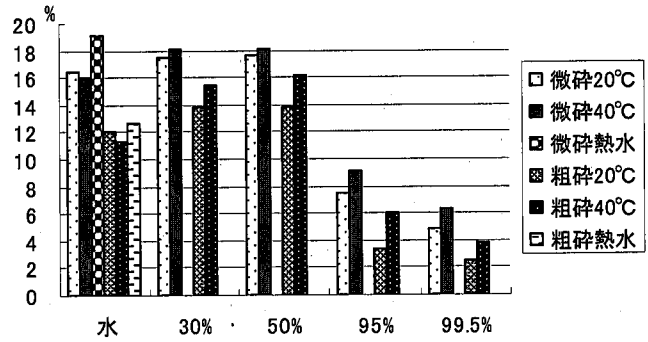


図2 各条件での抽出率

以上の結果から、クズ蔓の抽出率は、粉碎した原料を使用し、水系が入った溶媒で抽出する方が高く、特に、熱水、エタノール30%およびエタノール50%が良好であることが判明した。

3.1.2 イソフラボノイドの含有量

抽出物中の総イソフラボノイドの含有量を図3に、抽出率を乗じて換算したクズ蔓中の総イソフラボノイド含有量を図4に示した。

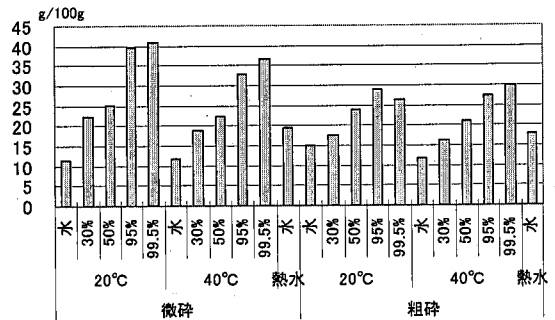


図3 抽出物中の総イソフラボノイド含有量

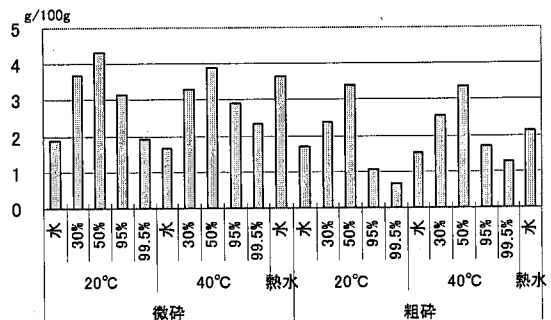


図4 クズ蔓原体中の総イソフラボノイド含有量

図3の結果から,抽出物のイソフラボノイドの含有量は,温度による差は顕著ではなかった.微砕クズ蔓の抽出物の方がイソフラボノイドの含有量が高く,特にエタノールの含有量が多いほど抽出物の純度が高いと言える.これは,クズ蔓に含まれる水溶性成分の糖質等が抽出物中に多く含まれる一方,エタノール抽出では,糖質等の抽出が少なかったためだと考えられる.

図4は,クズ蔓原体あたりのイソフラボノイド含有量であるが,エタノール抽出では抽出率が低いために原体あたりの含有量が少なくなってしまう.その結果,図のとおり,微砕クズ蔓,粗砕クズ蔓,20℃,40℃,いずれにおいても50%エタノールによる抽出で最もイソフラボノイド含有量が高かった.

クズ蔓原体あたりのイソフラボノイドの組成について微砕クズ蔓の結果を図5に,粗砕クズ蔓の結果を図6に示した.いずれの抽出方法に於いても,クズ特有の成分であるプエラリンの含有量が最も高く,さらに大豆に含まれるイソフラボノイドであるダイジン,マロニルダイジン,ダイゼインも含有している.しかし,これらは配糖体であり,容易に加水分解するため,水系の溶媒では抽出時間条件についての検討も必要である.

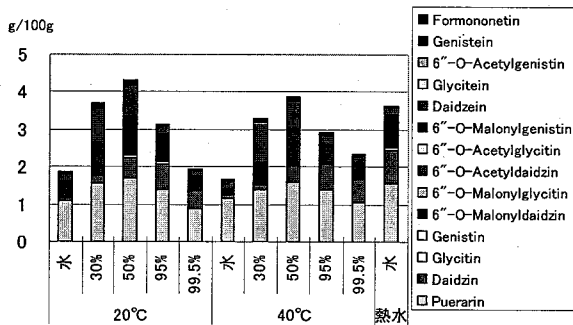


図5 クズ蔓原体あたりイソフラボノイド(微砕)

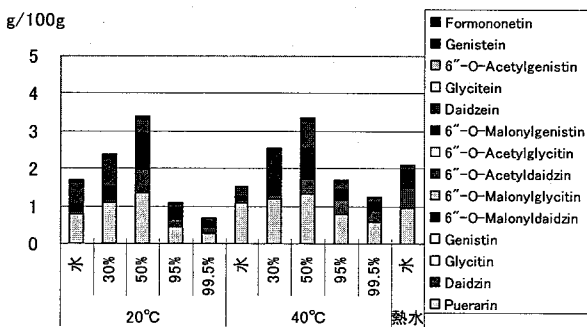


図6 クズ蔓原体あたりイソフラボノイド(粗砕)

以上の結果から,前述の抽出効率の結果と併せてクズ蔓からイソフラボノイドを効率的に抽出する条件として,微砕クズ蔓を使用して50%エタノールを用いる抽出法が優れていると考えられる.

3.2 クズの部位別イソフラボノイドの分布結果

3.2.1 抽出率

クズの抽出率(5回合計)を表4に,抽出回数ごとの抽出率を99.5%エタノールについては図7に,50%エタノールについては図8に示した.先述の結果からも明らかなように,水が混入した系で抽出率が高い傾向がここでも確認された.蔓での抽出率が低いのは,溶媒量を5倍で実施したため,1回目の抽出では試料が溶媒を吸収し,抽出液の回収量が減少したことが原因であると考えられる.

表4 クズの部位別抽出率(5回合計)

エタノール	葛根	蔓	葉	花	種子
99.5%	9.5	3.2	7.5	9.4	6.8
50%	30.8	13.0	18.0	40.2	17.4

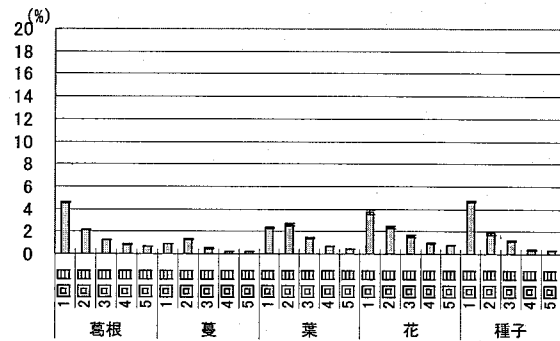


図7 クズの部位別抽出率(99.5%エタノール)

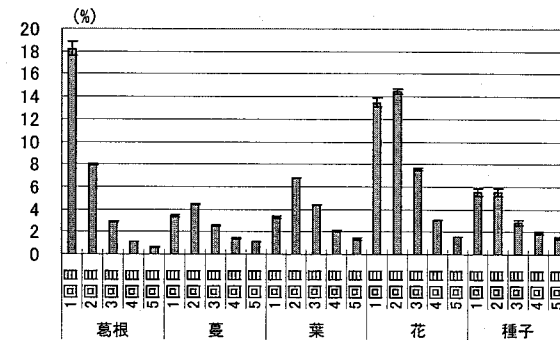


図8 クズの部位別抽出率(50%エタノール)

3.2.2 イソフラボノイドの含有量

抽出物を抽出回数ごとにイソフラボノイド含有量を分析し,5回分の合計量でクズ原体あたりの総イソフラボノイド含有量をもとめたものを図9に示した.また,99.5%エタノール抽出での葛根と蔓のイソフラボノイド組成を図10および図11に示した.

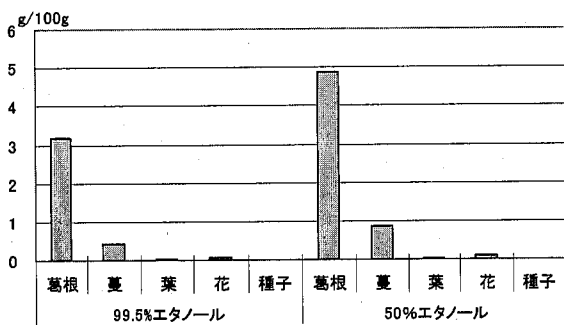


図9 クズの部位別総イソフラボノイド含有量

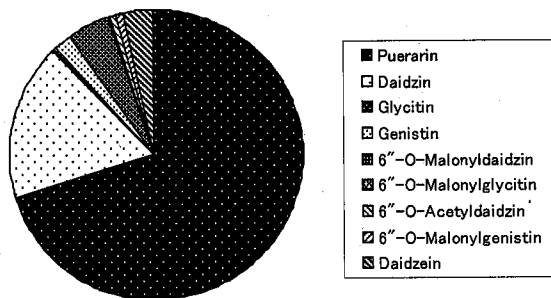


図10 葛根のイソフラボノイド組成(99.5%エタノール)

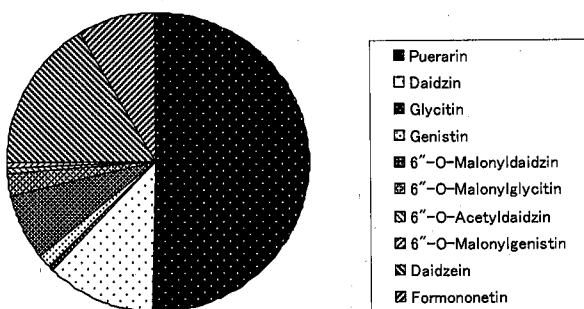


図11 蔓のイソフラボノイド組成(99.5%エタノール)

これらの結果から、総イソフラボノイド含有量が最も多いのは葛根で、ここでは数値データを示していないが、蔓の約5倍量含有していた。また、葉、花については、蔓の10分の1程度の含有量であった。一方、種子についてはこの分析方法では検出しなかった。

99.5%エタノール抽出物でのイソフラボノイド組成比は、葛根の主成分がプエラリン70%であり、蔓では50%がプエラリンであった。蔓では、ダイゼイン、フォルモノネチンが多く、特にフォルモノネチンは、蔓に局在していると考えられる。

4. 結言

食品への添加を目的として、水系溶媒を用いてクズの蔓から効率的にイソフラボノイドを抽出する方法を検討した。その結果、粉碎したクズ蔓を用い、50%エタノールを用いた抽出法が、抽出率、イソフラボノイド含有量ともに優れていることがわかった。また、抽出物のイソフラボノイド純度は99.5%エタノールによる抽出が良好であった。

また、クズの部位別イソフラボノイド含有量は、葛根が最も多く、その主成分は70%がプエラリンであった。一方、蔓では50%がプエラリンであった。

今後、実用化に向けて抽出物に関する安定性等の試験を実施し、製品化を進めていく予定である。

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ならびに農業総合センター高原農業振興センター中野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、古都奈良の新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) 清水浩美, 都築正男, 松澤一幸: 奈良県工業技術センター研究報告,(33),46-48,2007