未利用レンコンに含まれるポリフェノールの吸収性に関する研究

食品工業部
鶴田裕美　柘植圭介
佐賀大学農学部
永尾晃治　柳田晃良

レンコンポリフェノール抽出物（LP）に含まれるプロアントシアニジン（PA）を分画し，分子量分布および抗酸化活性について検討した．レンコンの PA は，高分子の PA を含む画分が全体の約 45%を占めた．抗酸化活性は，2 量体～4 量体の PA を多く含む画分とモノマーのカテキンを多く含む画分で最も高かった．レンコンポリフェノールの吸収性について調べるため，ラットに経口投与を行なったところ，分画前の LP 投与では，投与後 2～3 時間で，カテキンおよびガロカテキンのグルクロン酸抱合体およびそれらのメチル化体の 4 種類の代謝物が血漿中に検出された．また，2～4 量体の PA を多く含む画分の投与では，メチルカテキンのグルクロン酸抱合体のみ検出された．したがって，レンコンポリフェノールの一部は血中に吸収されていることが確認された．

１．はじめに

佐賀県は，全国 3 位，九州 1 位（平成 23 年度）とレンコンの生産量が多い地域である．その一方で，通常よりも味や外観などの品質が劣るために廃棄される未利用レンコン（図１）の量も多いのが現状である．県内では，出荷量の約２割から３割が年間に廃棄されると言われており，これらの有効利用法が求められている．

我々は，これまでに，未利用レンコンを新たな機能性食品素材として利用することを目的として研究を行ってきた．これらの研究の中では，レンコンに含まれるポリフェノールは，主にカテキンおよびガロカテキンを構成成分としたプロアントシアニジン（PA）であり（図２），肥満モデルマウスの脂肪肝を改善することを認めている [1-4]．

レンコンポリフェノール摂取による脂肪肝改善のメカニズムとして，肝臓脂肪酸合成酵素遺伝子発現および活性の低下によることを認めているが [3-4]，レンコンポリフェノール抽出物（LP）に含まれる PA の分子量に関する情報やその特性，体内吸収性に関しては不明なままである．

そこで, 本研究では LP をゲルろ過によって分子量分画し，ポリフェノールの代表的な機能性である抗酸化活性および分子量の測定を行なった．また，ラットを用いて経口投与を行い，レンコンポリフェノールおよびその分画物の体内吸収性について経時的に調べた．

２．実験方法

2.1 試料調製

レンコンは，佐賀県農業試験研究センター白石分場から供与された．可食部を水洗い後，真空凍結乾燥を行った．粉砕機で粉末化したものをレンコン乾燥粉末試料とした．

2.2 抽出方法

(1) LP の調製

LP の調製は以下の手順によって行った．レンコン乾燥粉末を 80%アセトン（Ac）で抽出後、減圧濃縮によって溶媒を除去した．水－ヘキサン分配後，水層を Diaion HP-20（三菱化学）を充填したカラムクロマトグ

図１ 未利用レンコン
（末節部位，変形，傷付いたレンコン）

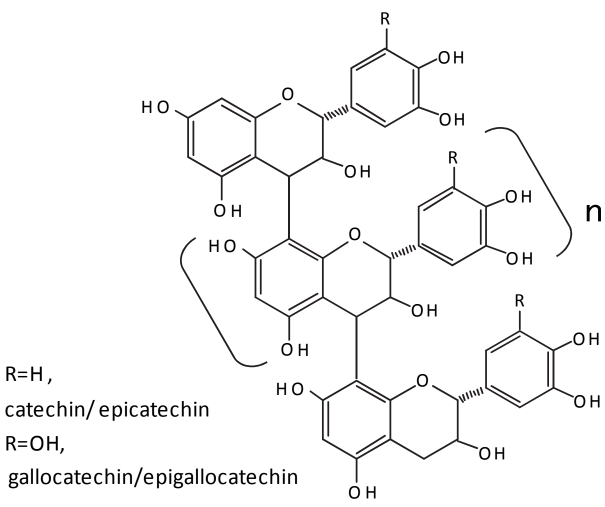

図２　レンコンポリフェノールの推定構造

ラフィーに供した．カラムを蒸留水で洗浄後，メタノールにてポリフェノール成分を溶出させた．減圧濃縮によって溶媒を除去したものを LP とした．

(2) LP の分画

LP を Sephadex LH-20（GE ヘルスサイエンスジャパン）カラムクロマトグラフィーに供し，水，60%メタノール（MeOH），80%MeOH，100%MeOH，70%Ac で順次溶出させた．減圧濃縮によって溶媒を除去後，得られた各分画物の重量を測定した．

2.3 ポリフェノール量の測定

ポリフェノール量の測定は Folin-Ciocalteu 法[5)]を一部改良して行なった．すなわち，96 穴マイクロプレートに 10 μL の試料溶液を加え，10 倍希釈したフォーリン・チオカルト試薬 75 μL を加えて攪拌し，室温で 5 分間静置した．さらに，2%炭酸ナトリウム溶液 75 μL を加え，攪拌し，室温で 15 分間静置後，750 nm での吸光度を測定した．標準物質にカテキンを用いて検量線を作成し，試料のポリフェノール量をカテキン当量として換算した．

2.4 プロアントシアニジン（PA）量の測定

PA 量の測定は，バニリン－塩酸法[6)] を用いて行なった．すなわち，試料 0.5 mL に 4% バニリン－メタノール溶液 3 mL を加え，攪拌した．さらに，塩酸 1.5 mL を添加し，攪拌後，室温で 15 分間静置後，500 nm での吸光度を測定した．標準物質にカテキンを用いて検量線を作成し, 試料の PA 量をカテキン当量として換算した．

2.5 LP および各分画物の LC/MS 分析

LP および LH-20 分画物は、50% MeOH（2 mg/mL）に溶解後、0.2 μm メンブレンフィルターでろ過し、分析に供した。LC/MS（高速液体クロマトグラフ質量分析装置・平成 17 年度電源立地地域対策交付金補助備品）の分析条件は以下のとおりである.

装置 : Agilent 社 1100 series/Brucker Daltnics 社 HCT-ultra
カラム：YMC diol NP-120 (150 mm×3 mm) + YMC diol NP-60 (150 mm×3 mm)，カラム温度 : 30℃，移動相 : A) 99% アセトニトリル /1% 酢酸　B) 95% MeOH /4% 水/1% 酢酸，グラジェント条件 : (0 min) 4% B→(5 min) 4% B→ (35 min) 40% B→(47.5 min) 50% B→(50 min) 90% B→(55 min) 90%B，流量 : 0.25 mL/min，蛍光検出器:Ex 276 nm / Em 316 nm, イオン化:negative mode, 乾燥ガス：N_2 350℃ 10L/min，ネブライザー：45 psig, キャピラリー電圧:4,000 V, SCAN 範囲:100～3,000 m/z

2.6 DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性を須田らの方法[7)]を用いて測定し，抗酸化能の評価を行った．すなわち，96 穴マイクロプレートに 200 mM MES 緩衝液(pH 6.0) 50 μL, 適宜希釈した試料溶液 50 μL を加え攪拌し，エタノールに溶解した 200 μM DPPH 溶液を加え，室温で 20 分間反応後，520 nm での吸光度を測定した．標準物質には, 抗酸化物質である Trolox を用いて検量線を作成し，DPPH の退色率から試料の抗酸化能を Trolox 当量として換算した．

2.7 ORAC(Oxygen radical absorbance capacity)の測定

ORAC 活性は，Cao らの方法[8-9)]に従い，マイクロプレートリーダ Molecular Devices 社 Spectra Max M5（平成 17 年度電源立地地域対策交付金補助備品）を用いて測定した．サンプルおよび標準物質の Trolox はリン酸緩衝液で適宜希釈した．96 穴マイクロプレートにブランク（リン酸緩衝液)，サンプル，標準物質 20 μL を分注し，各ウェルに 96 nM Fluoresein sodium salt 200 μL を加えた. 10 分間のプレインキュベーション後, 31.7 mM 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride 75 μL を加え，攪拌後，蛍光強度を測定した．ORAC 値は，蛍光強度の減衰曲線下面積を算出し，検量線から Trolox 相当量として表した．マイクロプレートリーダの条件は以下のとおりである.

励起波長 : 485 nm, 蛍光波長 : 525 nm, Cut off: : 515 nm,
測定間隔 : 2 分, 測定時間 : 90 分間, 測定回数 : 46 回,
恒温器 : 37℃

2.8 LP および分画物の体内吸収性

7 週齢の雄ラットを 12 時間絶食させ、体重を測定後，対照群（蒸留水)，LP 群（LP 40 mg/kg body weight)，80%MeOH 群（80% MeOH 画分 40 mg/kg body weight）の 3 群（n=3）に分けた．LP および 80% MeOH 画分は蒸留水に溶解し，経口ゾンデを用いて投与した．0～5

時間まで（1 時間毎）経時的に尾静脈血 200 μL を回収し，血漿を得た．なお，本動物実験は，佐賀大学動物実験委員会の規則に従い行なった．

2.9 血漿サンプルの LC/MS^3 分析

血漿は Roura らの方法[10]に従い, 前処理を行なった．LC/MS^3 の分析条件は以下のとおりである．

カラム : imtakt CD-C18 (250 mm×2 mm)，カラム温度 : 37℃，移動相 : A) 0.1% 酢酸　B) 99.9% アセトニトリル/0.1% 酢酸，グラジェント条件 : (0 min) 4% B→(30 min) 30% B→ (40 min) 100% B→(50 min) 100% B，流量 : 0.2 mL/min, DAD : 280 nm, イオン化 : negative mode, 乾燥ガス : N_2 350℃ 10L/min，ネブライザー : 45 psig, キャピラリー電圧 : 4,000 V, SCAN 範囲 : 100～2,000 m/z

3．結果および考察

3.1 LP 分画

レンコン乾燥粉末 284 g から LP は 5.6 g 回収された．図３に LP を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにて分画した結果を示す．LP の分画物の収量は，メタノール濃度が高くなるにつれて増加し，70%Ac で溶出した画分が LP 全体の約 45%を占めた．

3.2 ポリフェノールおよび PA 量

表１に LP および分画物のポリフェノール量と PA 量を示す．分画前の LP に比べて，H_2O 画分ではポリフェノール量が低く，PA はほとんど含まれていなかった．ポリフェノール量は，80%MeOH 画分で最も高い値を示した．PA 量については，80%MeOH 画分および 70%Ac 画分で 100%を超える値が認められ，80%MeOH 画分以降の画分はほぼ PA のみで構成されていることが示唆された．また，80%MeOH 画分および 70%Ac 画分で PA 量が 100%を超えて算出されたのは，標準品としてモノマーのカテキンを用いたことによるものと推察される．

3.3 LP および分画物の LC/MS 分析

図４に LP および分画物を順相 HPLC で分析した結果を示す．蛍光強度によるクロマトグラフに質量分析

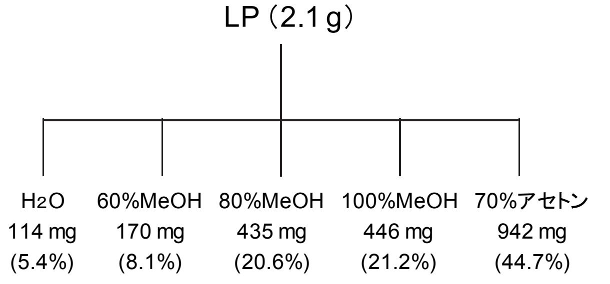

図３　LP の Sephadex LH-20 による分画

表１　LP 分画物のポリフェノールおよび PA 量

	ポリフェノール量 (mg /g Catechin eq.)	PA 量 (mg /g Catechin eq.)
LP	924	999
H_2O	262	29
60%MeOH	858	892
80%MeOH	989	1140
100%MeOH	775	999
70%Ac	930	1070

(eq : equivalent)

による結果を組み合わせたところ, 分画前の LP ではモノマーのカテキンおよびガロカテキンが約 20 分以内に検出され, 順次 2 量体から 4 量体までの PA が確認された．H_2O 画分ではガロカテキン，60%MeOH 画分ではカテキンと 2 量体の PA が僅かに認められた．80% MeOH 画分では主に 2 量体から 4 量体の PA が検出された．100%MeOH 画分および 70%Ac 画分では，カテキンやガロカテキンの重合度が高くなるにつれて蛍光強度が低くなるため，明確なピークが認められなかった．測定データは示していないが，これらの画分を MALDI-TOF MS 分析すると，100%MeOH 画分は 3 量体から 8 量体，70%Ac 画分は 5 量体から 20 量体までの PA に匹敵する質量数が確認された．LP は，その約 45%が 70%Ac 画分であることから，高分子の PA を多く含むと考えられる．

3.4 抗酸化活性

表２に LP および分画物の抗酸化活性を示す．DPPH ラジカル消去活性は, ポリフェノールと PA 含量の少ない H_2O 画分ではほとんど認められなかった．他の画分については，80%MeOH 画分が最も高かった．ORAC 値については，60%MeOH 画分が最も高く，70%Ac 画分の ORAC 値は，分画前よりも低い値を示した．PA

表２　LP 分画物の抗酸化活性

	DPPH 消去活性 (mmol TE /g)	ORAC (umol TE /g)
LP	6.52	7043
H_2O	0.65	3314
60%MeOH	7.14	14685
80%MeOH	8.04	12485
100%MeOH	6.16	8333
70%Ac	6.39	5582

(TE:Trolox equivalent)

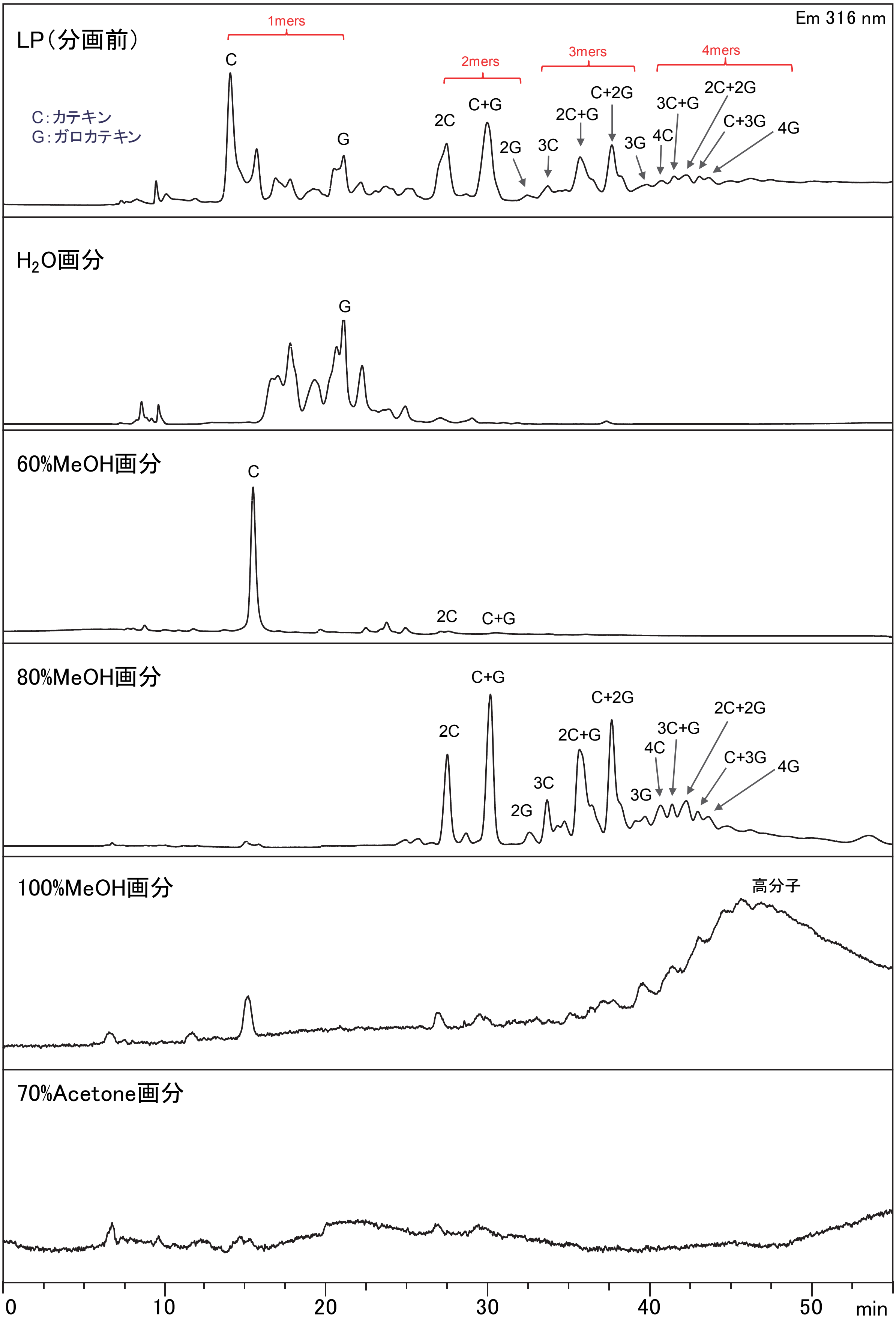

図４　レンコンポリフェノールおよび分画物の順相 HPLC 分析

の重合度が高くなるにつれて ORAC 値は低下する傾向が認められた．DPPH ラジカル消去活性と ORAC による抗酸化活性の評価では，両者で若干傾向が異なるものの，モノマーのカテキンやオリゴマーの PA を含む画分の活性が高いことが認められた．

3. 5 LP および 80%MeOH 画分の体内吸収性

LP および強い抗酸化活性を示す 80%MeOH 画分の体内吸収性について調べるため，それぞれをラットに経口投与し各群の血漿に含まれる代謝物を経時的に分析した．その結果，対照群ではカテキンや PA に由来するような代謝物のピークは検出されなかった．LP 投与の場合には，LP 投与 1 時間後の血漿について，カテキンの分子量（[M-H]- = 289 m/z）を MS^n クロマトグラムから抽出し，投与前後で増加したピークを検出した（図５）．マススペクトルを MS^3 まで比較したところ，MS^1 で[M-H]- = 465 m/z，MS^2 で[M-H]- = 289 m/z，MS^3 で[M-H]- = 245 m/z のイオンが認められ，本ピークは，カテキンのグルクロン酸抱合体（C-GlcA）であることが

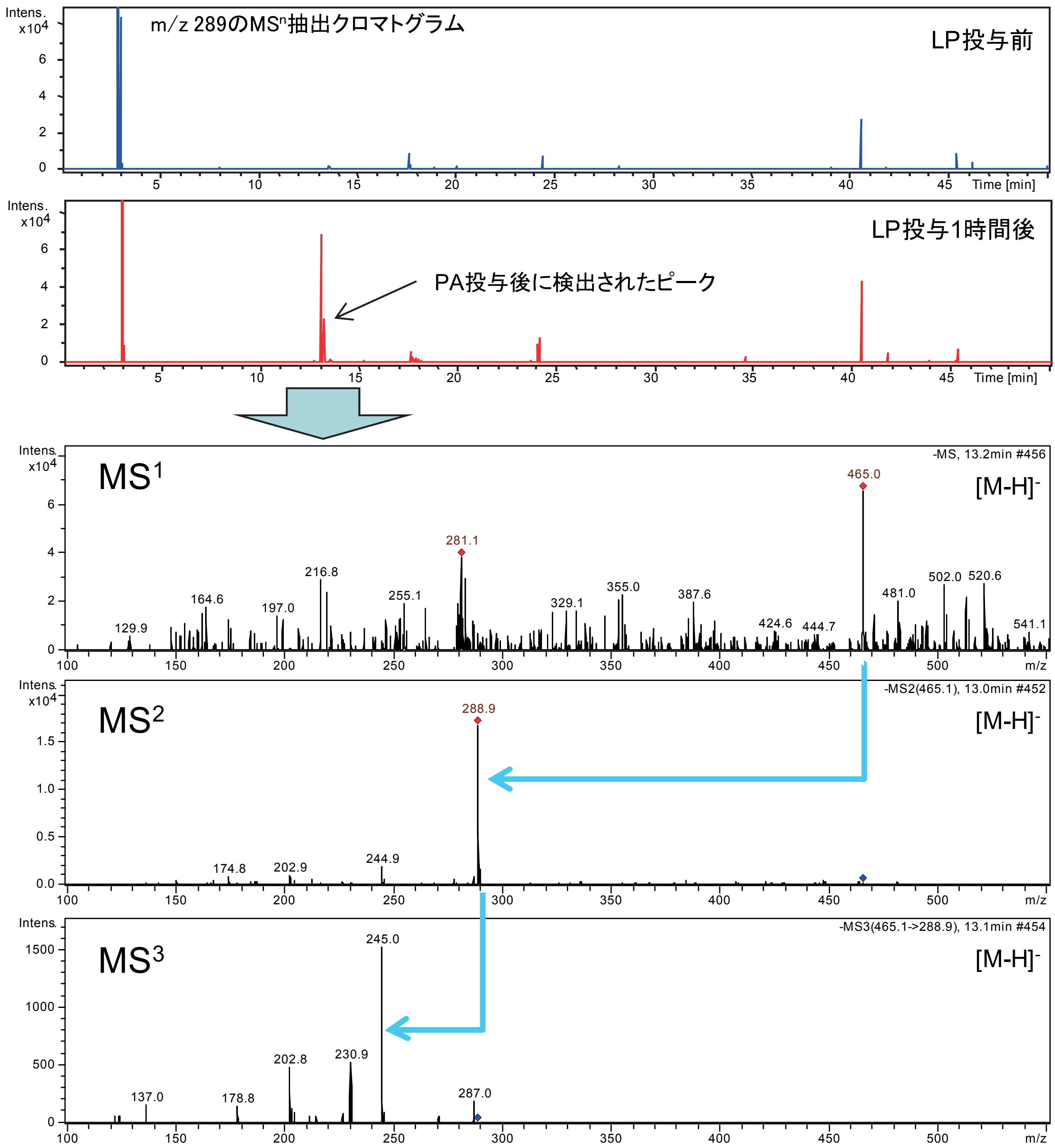

図５　血漿中のカテキングルクロン酸抱合体の LC/MS³ による解析

表３　LP および 80%MeOH 画分投与ラットの血漿中に検出された代謝物

Group	0h	1h	2h	3h	4h	5h
LP	ND	C-GlcA Me-GC-GlcA Me-C-GlcA	GC-GlcA C-GlcA Me-GC-GlcA Me-C-GlcA	GC-GlcA C-GlcA Me-GC-GlcA Me-C-GlcA	Me-C-GlcA	Me-C-GlcA
80%MeOH	ND	Me-C-GlcA	Me-C-GlcA	Me-C-GlcA	Me-C-GlcA	Me-C-GlcA

ND：Not detected，GC-GlcA：Gallocatechin glucronide，C-GlcA：Catechin gluclonede，Me-GC-GlcA：Methyl gallocatechin glucronide，Me-C-GlcA：Methyl catechin glucronide

確認された．同様の手法で他の血漿についても解析したところ，ガロカテキンのグルクロン酸抱合体（GC-GlcA）[M-H]- = 481 > 305 > 179 m/z，メチルガロカテキンのグルクロン酸抱合体（Me-GC-GlcA）[M-H]- = 495 > 319 > 275 m/z，メチルカテキンのグルクロン酸抱合体（Me-C-GlcA）[M-H]- = 479 > 303 > 259 m/z の存在が認められた．検出された代謝物を 80% MeOH 画分投与の結果と併せて表３に示す．LP 群では，投与 1 時間後で C-GlcA, Me-GC-GlcA および Me-C-GlcA が検出された．投与 2 時間および 3 時間後では 4 種類すべての代謝物が検出された．投与 4 時間および 5 時間後では Me-C-GlcA のみ検出された．

一方，80%MeOH 画分の投与では，全て投与時間で Me-C-GlcA が検出されたが，他の代謝物は検出されなかった．したがって，レンコンのポリフェノールは，一部は吸収され，主にグルクロン酸抱合体として存在していることが認められた．また，80%MeOH 群に比べて，LP 群の血漿に含まれる Me-C-GlcA の方が検出されたイオン強度が高く，且つ多種の代謝物が検出されたことから，オリゴマーPA よりもモノマーのカテキン類の方が体内に吸収されやすいことが示唆された．また，Deprez らも，ヒトの小腸由来培養細胞系において，オリゴマーの PA は，モノマーのカテキンに比べて吸収率が 10 倍以上低いことを報告している [11]．

今回は，レンコンのポリフェノールの吸収性について，定性的に調べたが，今後は，グルクロニダーゼによる脱抱合化を行い，血中に吸収されたカテキン類の定量を行う予定である．

４．おわりに

本研究では，レンコンのポリフェノール抽出物の分画を行い，分子量分布や抗酸化活性について調べた．レンコンのポリフェノールは主に PA から構成されており，5 量体～20 量体の PA を多く含むことが認められた．ポリフェノールの代表的な機能性である抗酸化活性について検討したところ，オリゴマーの PA を含む 80%MeOH 画分とモノマーのカテキンを多く含む画分で特に高い活性が認められた．

また，LP と分画物の中で抗酸化活性が高く，比較的量も多かった 80%MeOH 画分の血中への吸収性を経時的に検討した．LP 投与群の血漿は，投与後 2～3 時間後で C-GlcA, GC-GlcA, Me-GC-GlcA および Me-C-GlcA の 4 種類の代謝物の存在が確認された．80%MeOH 画分の投与では，Me-C-GlcA のみ血中への存在が確認され，重合度の高い PA については，吸収性が低いことが示唆された．本研究では，PA がインタクトな状態で検出されず，4 種類の代謝物の全てがモノマーのカテキン類に起因するのか，低分子の PA に起因するものかは不明である．今後，PA の吸収性について，確認する場合は，混合物ではなく，単離した PA を用い，且つ投与量をより多くする必要があるかも知れない．

最後に，本研究は，独立行政法人科学技術振興機構研究成果展開事業「研究成果最適展開支援プログラム」平成 23 年度第 2 回「A-STEP 探索タイプ」の助成を受けて実施したものです．また，本研究に試料をご提供頂きました佐賀県農業試験研究センター白石分場に感謝致します．

参考文献

１）鶴田裕美，柘植圭介，吉村臣史，小金丸和義，柳田晃良，永尾晃治：佐賀県工業技術センター研究報告書，**16**, 51-53 (2007)
２）鶴田裕美，柘植圭介，吉村臣史，小金丸和義，柳田晃良，永尾晃治：佐賀県工業技術センター研究

報告書，**18**, 41-47 (2009)

３）Tsuruta Y, Nagao K, Shirouchi B, Nomura S, Tsuge K, Koganemaru K, Yanagita T. : Effects of Lotus root (the edible rhizome of Nelumbo nucifera) on the deveolopment of non-alcoholic fatty liver disease in obese diabetic db/db mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. **76** (3), 462-466 (2012)

４）Tsuruta Y, Nagao K, Kai S, Tsuge K, Yoshimura T, Koganemaru K, Yanagita T. : Polyphenolic extract of lotus root (edible rhizome of Nelumbo nucifera) alleviates hepatic steatosis in obese diabetic db/db mice. *Lipids Health Dis*. **10**, 202 (2011)

５）Sun T, Tang J, Powers J. R.: Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. *J. Agric. Food Chem.*, **53** (1), 42-48 (2005).

６）Sun JS, Tsuanga YH, Chen IJ, Huang WC, Hang YS, Lu FJ.: An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. Burns, 24, 225-231 (2000).

７）須田郁夫，食品機能研究法，光琳，218-220 (2000).

８）Cao G, Prior RL.: Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. Methods Enzymol. **299**: 50-62. (1999)

９）食品機能性評価支援センター編，食品機能性評価マニュアル集第Ⅱ集，79-86 (2008)

10）Roura E, Andrés-Lacueva C, Jáuregui O, Badia E, Estruch R, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventós RM. : Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to quantify plasma (-)-epicatechin metabolites after ingestion of a standard portion of cocoa beverage in humans. *J Agric Food Chem*. **53**(16):6190-6194. (2005).

11）Deprez S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A.: Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal*. **3**(6):957-67. (2001).