

## 6 次産業化を志向した県産農林資源からの機能性素材探索に関する研究（第 3 報） -コゴミ (*Matteuccia struthiopteris*) に含まれる機能性成分の探索-

食品工業部

鶴田裕美 岩元彬 柘植圭介

佐賀県が中山間地域で栽培普及を行っているコゴミ（クサソテツの若芽）の高付加価値化を目的として、コゴミに含まれるキサンチンオキシダーゼ（XOD）阻害成分の探索を行った。本報では、高速溶媒抽出装置を使用した連続抽出法を用い、XOD 阻害活性を有する 75%エタノールおよび 50%エタノール抽出物を C18 固相抽出カラムで分画し、阻害活性成分を調べた。その結果、両抽出物ともに 0.1%酢酸含 30%メタノール溶液抽出画分で高い XOD 阻害活性と高い総ポリフェノール量が認められた。また、関与成分は、コゴミの既知成分であるクロロゲン酸以外のポリフェノール類であると推定される。

### 1. はじめに

近年、農林漁業者の収入増加、生産物や加工品の高付加価値化を目的として、農林水産物の 6 次産業化が盛んに行われている。6 次産業化とは、農林漁業者（1 次産業）が、食品加工（2 次産業）と流通・販売（3 次産業）にも取り組み、多角的な経営を行う状態を意味する<sup>1)</sup>。6 次産業化の推進には、地域の特色を活かした食品のブランド化や食品の機能性を明らかにして農産物の価値を高めることが販売促進の一助となる。

山菜の一種であるコゴミは、クサソテツ (*Matteuccia struthiopteris*) の若芽（図 1）で日本各地に生息しており、佐賀県では、農業試験研究センター三瀬分場を中心に中山間地域での栽培普及活動を行っている。

我々は、以前の研究で、コゴミの凍結乾燥粉末から高速溶媒抽出装置（図 2）を用いた連続抽出法にて抽出物を調製し、含水エタノール抽出物がキサンチンオキシダーゼ（XOD）阻害活性や高い抗酸化活性を有することを報告し、高尿酸血症や痛風の予防に有効である可能性を示した<sup>2,3)</sup>。

XOD は、プリン体代謝経路の最終 2 段階を触媒する酵素であり、ヒポキサンチン、キサンチンから尿酸を生成する。血中の尿酸が過剰になると痛風や腎障害を発症すると言われており、現在、これらの治療薬としてアロプリノール等の XOD 阻害剤が処方されている。

また、最近では、XOD 阻害作用を有するアンセリン、菊花ポリフェノールおよびアンペロプシン等を関与成分とする尿酸値低下作用を訴求した機能性表示食品の届け出数が急激に増加しており、尿酸値低下作用を有する食品へ期待が高まっていると考えられる<sup>4,7)</sup>。

そこで、本研究では、コゴミを機能性食品素材とし

て有効利用することを目的とし、コゴミの XOD 活性阻害成分の探索を行った。XOD 阻害活性が認められたコゴミの 75%エタノール抽出物および 50%エタノール抽出物について、固相抽出カラムによる分画を行い、XOD 阻害活性成分の探索を試みた結果を報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試薬類

実験に使用する試薬類について、海砂（40～80 mesh）はナカライテクス社（京都）製、Trolox は BIOMOL Research Labs. Inc. (USA) 製、Fluorescein, sodium salt は Sigma-Aldrich Inc. (USA) 製、2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES) は株式会社同仁化学研究所（熊本）製、XOD はオリエンタル酵母工業株式会社（東京）製（EC 1.17.3.2, Butter milk 由来）を用いた。その他の試薬は、富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）製を用いた。



図 1 コゴミ (*Matteuccia struthiopteris*)



図 2 高速溶媒抽出装置

## 2.2 試料調製および抽出操作

コゴミは、凍結乾燥後、ハンマークラッシャー（メッシュ孔径 2 mm）で粉碎し、試料とした。抽出は、高速溶媒抽出装置（Thermo Fisher Scientific, Dionex ASE-350）を用いた。高速溶媒抽出法は、高温・高圧条件下で固体試料から成分を短時間で効率的に抽出する方法である。バッチ式抽出法に比べて、異なる溶媒による連続抽出も容易に行うことができるのが特徴である。具体的には、コゴミ凍結乾燥粉末 5 g を精秤し、洗浄した海砂 30 g と混合後、抽出セル（99 mL）に充填した。1 つの抽出セルに対し、ヘキサン、エタノール、75%エタノール、50%エタノールの順に連続的に抽出を行った。高速溶媒抽出装置の抽出条件は表 1 に示したとおりである。捕集瓶に回収された抽出液を減圧濃縮乾固後、1% DMSO 溶解液を各種分析に供した。

また、XOD 阻害活性が高かった 75%エタノール抽出物および 50%エタノール抽出物の一部は、以下の分画操作に用いた。

### 2.3 抽出物の分画

75%エタノール抽出物および 50%エタノール抽出物各 300 mg を 0.1%酢酸含 5%メタノール溶液に溶解した。コンディショニング済みの固相抽出カートリッジ Sep-pak C18 2g（Waters 社製）に通液後、0.1%酢酸含 5%メタノール溶液 12 mL で洗浄した。12 mL の 0.1%酢酸含 15%メタノール溶液→0.1%酢酸含 15%メタノール溶液→0.1%酢酸含 30%メタノール溶液→0.1%酢酸含 60%メタノール溶液→エタノールの順で溶出させ、回収した溶液を減圧濃縮乾固した。1% DMSO に溶解し、各種分析に供した。

表 1 高速溶媒抽出装置による抽出条件

項目	条件
抽出溶媒	ヘキサン→エタノール→75%エタノール→50%エタノール
加熱温度	40℃
加熱時間	5 分
静置時間	5 分
サイクル数	3 回
リンス量	110 %
窒素パーシ	200 秒
圧力	1,500 psi

## 2.4 キサンチンオキシダーゼ（XOD）活性の測定

XOD 活性の測定は、Nguyen ら<sup>8)</sup>の方法を一部改変して行った。すなわち、96 穴マイクロプレートに、コントロール（1% DMSO）または試料溶液 35  $\mu$ L、75 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）50  $\mu$ L および XOD（0.01 units/mL リン酸緩衝液溶解）30  $\mu$ L を加え、37℃ で 15 分間予備加温した。450  $\mu$ M キサンチン溶液（リン酸緩衝液溶解）60  $\mu$ L を加え、37℃ で 60 分間反応させた後、1 M 塩酸 25  $\mu$ L を加えて反応を停止した。生成した尿酸量は、市販の測定キット：尿酸 C-テストワーカーを用い、常法に従って測定した。XOD 阻害率は以下の計算式より算出した。

$$\text{XOD 阻害率 (\%)} = 100 - (A \div B) \times 100$$

A：試料溶液の尿酸産生量

B：コントロールの尿酸産生量

また、アロプリノール（市販の痛風治療薬：XOD 阻害剤）を陽性対照として同様に測定した。

## 2.5 総ポリフェノール（TP）量の測定

総ポリフェノール量の測定は Folin-Ciocalteu 法<sup>9)</sup>を一部改良して行った。すなわち、96 穴マイクロプレートに 10  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L を加え、攪拌し、室温で 15 分間静置後、750 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー（Molecular Devices, Spectra Max M5）を用いて測定した。標準物質に没食子酸を用いて検量線を作成し、試料のポリフェノール量を没食子酸当量として換算した。

## 2.6 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl（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<sup>10)</sup>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  $\mu$ L、

適宜希釈した試料溶液 50  $\mu$ L を加え、攪拌した。エタノールに溶解した 200  $\mu$ M DPPH 溶液を加え、室温で 20 分間反応後、520 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Spectra Max M5) を用いて測定した。標準物質には、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 親水性活性酸素吸収能(H-ORAC)の測定

H-ORAC は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の H-ORAC 分析法標準作業手順書<sup>1)</sup>に従い、蛍光マイクロプレートリーダー (TECAN, Infinite 200 PRO) を用いて測定した。試料溶液および標準物質の 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)、試料溶液、標準物質 35  $\mu$ L を分注し、各ウェルに 100.7 nM Fluorescein sodium salt 溶液 115  $\mu$ L 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 50  $\mu$ L を加え、攪拌後、蛍光強度を測定した。H-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。蛍光マイクロプレートリーダーにおける測定条件は表 2 のとおりである。

## 3. 結果および考察

### 3.1 高速溶媒抽出法による抽出物の収量および XOD 阻害活性

コゴミ乾燥粉末 5 g をヘキサン→エタノール→75%エタノール→50%エタノールで順次抽出した (図 3)。表 3 に減圧濃縮乾固後の抽出物の収量、収量比および供試量に対する回収率を示す。その結果、抽出物の収量は 75%エタノールが最も多く、次いでエタノール、50%エタノールの順で多かった。全体として、供試量の 43.6%が抽出された (表 3)。また、各抽出物の XOD 阻害活性は、以前の報告と同様の結果を示し、50%エタノールで最も阻害率が高く、次いで 75%エタノール抽出物で高かった (図 4)。したがって、これらの抽出物

表 2 ORAC 測定条件

項目	条件
励起波長	485 nm
蛍光波長	535 nm
測定間隔	2 分
測定時間	90 分
測定回数	46 回
恒温器	37°C



図 3 高速溶媒抽出法によるコゴミの抽出液  
①ヘキサン, ②エタノール, ③75%エタノール,  
④50%エタノール

表 3 高速溶媒抽出法によるコゴミ抽出物の収量

抽出溶媒	収量 (g)	収量比 (%)	回収率 (%)
①ヘキサン	0.0838	3.8	1.7
②エタノール	0.4912	22.5	9.8
③75%エタノール	1.2106	55.6	24.2
④50%エタノール	0.3934	18.1	7.9
合計	2.179	100.0	43.6

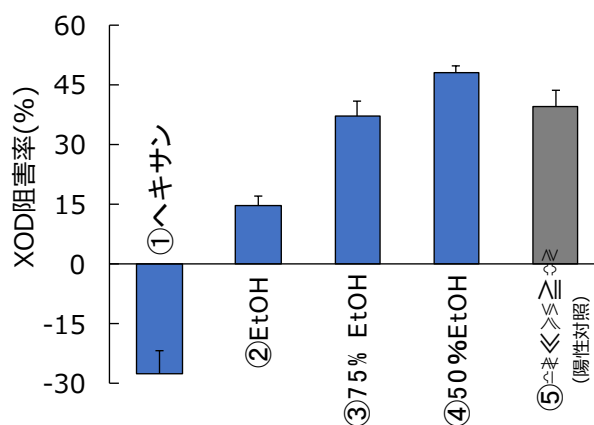


図 4 コゴミ抽出物の XOD 阻害活性

酵素反応時濃度 : 100  $\mu$ g/mL, 陽性対照 : 0.1  $\mu$ g/mL,  
(平均  $\pm$  標準偏差, n=6)

について分画を行い、活性成分の探索を試みた。

### 3.2 分画物の収量および XOD 阻害活性

75%エタノール抽出物を固相抽出カラムで A~E の 5 分画に分画した収量を表 4 に、分画物の XOD 阻害活性を図 5 に示す。その結果、抽出物の約 6 割は分画物 A として、カラムに吸着せず素通りして溶出した。XOD 阻害率は、2 番目に収量が多かった分画物 C で最も高



く、次いで分画物 D で高かった。分画前の 75%エタノール抽出物に比べて、分画物 C で約 3 倍、分画物 D で約 2 倍高い値を示した。

50%エタノール抽出物を固相抽出カラムで A'~E' の 5 画分に分画した収量を表 5 に、分画物の XOD 阻害活性を図 6 に示す。その結果、75%エタノール抽出物を分画した結果と同様、抽出物の約 6 割は分画物 A' として、カラムに吸着せず素通りして溶出したが、分画物 A と異なり分画物 A' では XOD 阻害活性は認められなかった。XOD 阻害率は、2 番目に収量が多かった分画物 C' で最も高く、次いで分画物 D' で高かった。分画前の 50%エタノール抽出物に比べて、分画物 C' と分画物 D' は約 2 倍高い値を示した。

### 3.3 分画物の TP 量

75%エタノール抽出物由来の分画物 A~E の TP 量を図 7 に示す。その結果、分画物 B, C および D で分画前の 75%エタノール抽出物より高い値が認められた。XOD 阻害活性が最も高かった分画物 C で TP 量が最も高く、XOD 阻害の関与成分がポリフェノール類である可能性が示唆された。

50%エタノール抽出物由来の分画物 A'~E' の TP 量を図 8 に示す。その結果、分画物 B', C' および D' で

表 5 50%エタノール抽出物の分画物の収量

分画物	溶出溶媒	収量 (mg)	収量比 (%)
A'	5%MeOH/0.1%酢酸	188.0	63.4
B'	15%MeOH/0.1%酢酸	16.0	5.4
C'	30%MeOH/0.1%酢酸	77.2	26.1
D'	60% MeOH/0.1%酢酸	13.0	4.4
E'	EtOH	2.1	0.7
合計		296.3	100.0

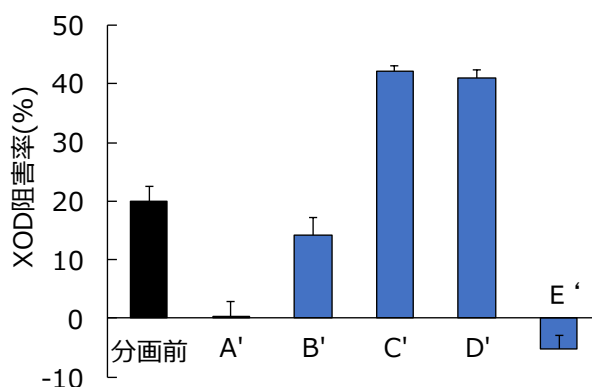


図 6 50%エタノール抽出物分画物の XOD 阻害活性  
酵素反応時濃度：20 µg/mL (平均±標準偏差, n=6)

表 4 75%エタノール抽出物の分画物の収量

分画物	溶出溶媒	収量 (mg)	収量比 (%)
A	5%MeOH/0.1%酢酸	193.3	61.2
B	15%MeOH/0.1%酢酸	37.0	11.9
C	30%MeOH/0.1%酢酸	52.7	16.9
D	60% MeOH/0.1%酢酸	23.3	7.5
E	EtOH	8.0	2.5
合計		312.3	100.0

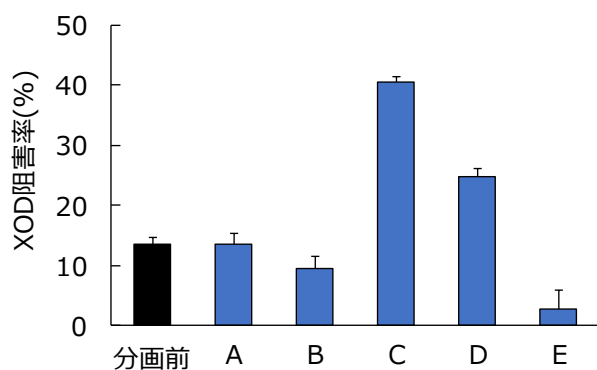


図 5 75%エタノール抽出物分画物の XOD 阻害活性  
酵素反応時濃度：20 µg/mL (平均±標準偏差, n=6)

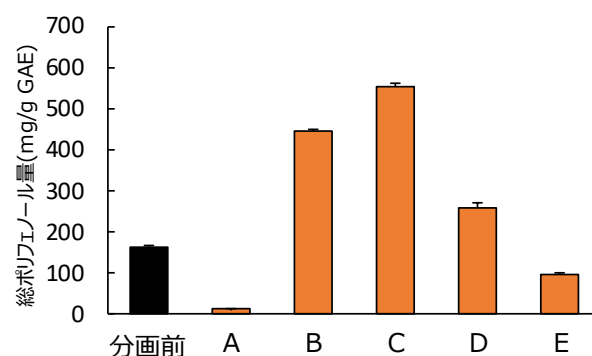


図 7 75%エタノール抽出物分画物の TP 量  
(GAE：没食子酸当量, 平均±標準偏差, n=4)

分画前の 50%エタノール抽出物より高い値が認められた。XOD 阻害活性が高かった分画物 C' および分画物 D' においても TP 量が高く、75%エタノール抽出物由来の分画物と同様 50%エタノール抽出物由来の分画物についても、XOD 阻害の関与成分はポリフェノール類である可能性が示唆された。現在、高速液体クロマトグラフ質量分析計による成分同定を行っており、分画物 B および B' については、コゴミの既知成分であるクロロゲン酸が主成分であることを認めているが、その他の分画物に含まれる成分については、現在解析中で

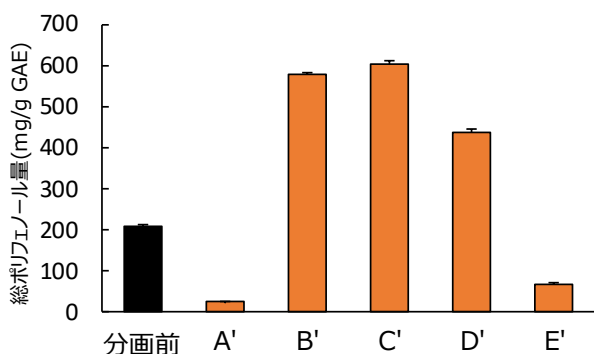


図 8 50%エタノール抽出物分画物の TP 量  
(GAE : 没食子酸当量, 平均±標準偏差, n=4)

ある<sup>12-13)</sup>.

### 3.4 分画物の抗酸化活性

表 6 に 75%エタノール抽出物由来の分画物 A~E の抗酸化活性を測定した結果を示す。その結果, DPPH ラジカル消去活性は, TP 量 (図 7) と高い正の相関 ( $r=0.995$ ) を示し, 分画物 C で最も高い値を示した。H-ORAC 値については, クロロゲン酸を多く含む分画物 B で最も高い値を示し, 分画物 C と D についても関与成分は不明であるが, 同程度の高い値が認められた。

表 7 に 50%エタノール抽出物由来の分画物 A'~E' の抗酸化活性を測定した結果を示す。その結果, DPPH ラジカル消去活性は, TP 量 (図 8) と高い正の相関 ( $r=0.997$ ) を示し, 分画物 C' で最も高い値を示した。H-ORAC 値については, クロロゲン酸を多く含む分画物 B' で最も高い値を示し, 分画物 C' と D' についても高い値が認められた。

### 4. おわりに

本研究では, コゴミの付加価値向上を目的とし, コゴミに含まれる XOD 阻害成分の探索を行った。以前の研究で, 高速溶媒抽出装置を用いた連続抽出法によって, 75%エタノール抽出物および 50%エタノール抽出物に XOD 阻害活性が認められた。今回は, これらの抽出物に含まれる XOD 阻害活性成分を明らかにするために C18 固相抽出カラムを用いて分画を行った。その結果, いずれの抽出物においても 0.1%酢酸含 30%メタノール溶液で溶出した分画物 C および C' で最も高い XOD 阻害活性が認められた。また, 両者はポリフェノール量が最も高く, 関与成分はクロロゲン酸以外のポリフェノールである可能性が高いが, 現在成分については解析中である。

今後, 未同定の機能性成分を明らかにし, 痛風や高尿酸血症の予防効果を有する機能性食品素材として有効活用していきたい。

表 6 75%エタノール抽出物分画物の抗酸化活性

分画物	DPPH 消去活性 ( $\mu\text{mol/g TE}$ )	H-ORAC 値 ( $\mu\text{mol/g TE}$ )
分画前	1473 ± 99.6	3909 ± 71.9
A	68 ± 4.5	379 ± 24.8
B	4425 ± 157.8	10078 ± 251.5
C	5812 ± 239.0	9450 ± 529.3
D	2132 ± 58.9	10050 ± 210.2
E	994 ± 15.3	1978 ± 40.8

(TE : Trolox 当量, 平均±標準偏差, n=4)

表 7 50%エタノール抽出物分画物の抗酸化活性

分画物	DPPH 消去活性 ( $\mu\text{mol/g TE}$ )	H-ORAC 値 ( $\mu\text{mol/g TE}$ )
分画前	2014 ± 59.5	3703 ± 104.7
A'	229 ± 1.5	475 ± 17.9
B'	5735 ± 154.7	11653 ± 292.9
C'	6428 ± 153.7	8206 ± 287.8
D'	4092 ± 53.6	8788 ± 315.1
E'	607 ± 11.7	1696 ± 10.3

(TE : Trolox 当量, 平均±標準偏差, n=4)

なお, 本研究を実施するにあたって使用した真空凍結乾燥機, マイクロプレートリーダー, 高速溶媒抽出装置は, 電源立地地域対策交付金で導入した。

### 参考文献

- 1) 農林水産省 HP : <http://www.maff.go.jp/j/shokusan/sanki/6jika.html>
- 2) 吉村臣史, 鶴田裕美, 柘植圭介 : 6 次産業化を志向した県産農林資源からの機能性素材探索に関する研究—コゴミにおける機能性素材としての可能性評価— : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **25**, 19-26 (2016)
- 3) 鶴田裕美, 岩元彬, 柘植圭介 : 6 次産業化を志向した県産農林資源からの機能性素材探索に関する研究—コゴミに含まれる機能性成分の探索— : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **26**, 27-36 (2017)
- 4) 消費者庁 HP : [https://www.caa.go.jp/policies/policy/food\\_labeling/about\\_foods\\_with\\_function\\_claims/](https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/about_foods_with_function_claims/)
- 5) 久保村大樹, 上野友哉, 松田秀喜 : アンセリンの健常者に対する継続投与時の血清尿酸値に及ぼす効果と安全性の検討 : 応用薬理, **94**(3/4), 37-42 (2018).
- 6) Hirano M, Takeda S, Hitoe S, Shimoda H.: Luteolin-rich

- chrysanthemum flower extract suppresses baseline serum uric acid in Japanese subjects with mild hyperuricemia. *Integr Mol Med*, 4 (2), 1-5 (2017).
- 7) 清水良樹, 櫻田剛史, 中川公太, 矢崎美里, 松岡小百合, 由井慶, 近藤澄夫, 齊藤次郎: アンペロプシン含有藤茶エキスおよびキトサン含有食品の長期摂取時の血清尿酸値への影響と安全性評価: 薬理と治療, 46 (1), 43-54 (2018).
- 8) M.T.T. Nguyen, S. Awale, Y. Tezuka, Q.L. Tran, H. Watanabe, and S. Kadota; Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medical plants. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(9), 1414-1421 (2004.)
- 9) 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).
- 10) 須田郁夫, 食品機能研究法, 光琳, 218-220 (2000)
- 11) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, H-ORAC 分析法標準作業手順書, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所(2013).
- 12) Kimura T, Suzuki M, Takenaka M, Yamagishi K, Shinmoto H. :L-O-Caffeoylhomoserine from *Matteuccia struthiopteris*. *Phytochemistry*. 65 (4), 423-426 (2004)
- 13) 木村俊之, 鈴木 雅博, 山岸 賢治, 新本 洋士: 国内特許第 3706906 号: カフェオイルホモセリン及びラジカル消去剤 (2005.8.12)