

スダチ果皮抽出物のスダチチン量と抗酸化活性

Sudachitin Contents and Antioxidative Activities of Sudachi Peel Extracts

新居 佳孝^{*1}, 岡久 修己^{*1}, 高田 次郎^{*1}, 三野 幸人^{*2}, 敷島 康普^{*3}

Yoshitaka Nii, Naoki Okahisa, Jiro Takata, Yukihito Mino and Yasuhiro Shikishima

抄 録

スダチチンはスダチ果皮から初めて同定されたポリメトキシフラボンの一種であるが、これまでその生理機能性は十分知られていなかった。そこで、スダチ果皮抽出物のスダチチンおよびデメトキシスダチチン量ならびに H-ORAC 法による抗酸化活性を測定した。スダチ果皮をエタノールで抽出し、合成吸着剤を用いて粗精製したスダチ果皮抽出液 (E-2G) のスダチチンおよびデメトキシスダチチン量はスダチ果皮に比べて約 4.8 倍に濃縮することができた。これを粉末化したスダチ果皮エキス末 (S-2G) ではさらに 2 倍以上濃縮された。抗酸化活性についても同様の傾向を示した。スダチチンおよびデメトキシスダチチンの精製品の抗酸化活性を測定したところ、デメトキシスダチチンがスダチチンよりも高いことが分かった。メトキシ基の数が抗酸化活性に影響している可能性がある。

1 はじめに

スダチ (*Citrus sudachi* Hort. ex Shirai) は徳島県において年間5,379トンの収穫量があり¹⁾、全国収穫量の約98%を占めている。その半分は生果として流通しているが、残りは搾汁した後、果汁がポン酢、ジュースおよび菓子などの原料として利用されている。搾汁時に発生する搾汁残渣 (主に果皮) は、大半が堆肥化されているが、さらなる有効利用が望まれている。

柑橘類の果皮には、多くのポリメトキシフラボン類が含まれており、発がん抑制作用、さらに糖尿病や高脂血症などの生活習慣病の改善効果などが報告されている²⁾⁻⁵⁾。

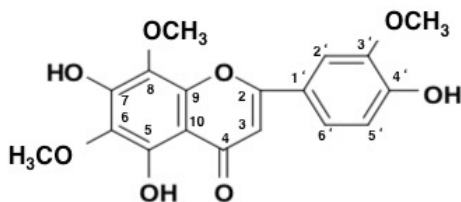


図 1 スダチチンの化学構造

スダチチン (図 1) は堀江らによりスダチ果皮から初めて同定されたポリメトキシフラボンの一種であるが⁶⁾、これまでその生理機能性は十分知られていなかった。近年、スダチチンによるマウスマクロ

ファージにおける抗炎症作用⁷⁾および食事誘発性肥満マウスにおける内臓脂肪の蓄積抑制効果⁸⁾が報告されている。一方、デメトキシスダチチンはスダチチンから3'位のメトキシ基が除かれた構造のフラボンであるが⁹⁾、生理機能性についての報告はこれまで見当たらなかった。

抗酸化活性とは酸化を防ぐ能力のことを指し、生体内において起こり得る過酸化脂質の生成、タンパク質の変性および遺伝子障害などを防ぎ、生活習慣病の予防をもたらすと考えられている¹⁰⁾。これまで抗酸化活性の測定は測定原理の異なる多種多様な方法で行われてきたが、生体内での酸化反応に近い状態で抗酸化活性が評価できる系である酸素ラジカル吸収能力 (oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 法が有用であると報告されている^{10,11)}。特に、ポリフェノールやアスコルビン酸などの成分に由来する抗酸化活性を評価できる親水性 ORAC (H-ORAC) 法は渡辺ら¹²⁾により妥当性の確認が終了している分析法であるため、それぞれの実験室で得られた測定値の比較が可能である。

そこで、スダチ果皮抽出物 (抽出液, エキス末) についてスダチチンおよびデメトキシスダチチン量ならびに H-ORAC 法による抗酸化活性を測定した。あわせて、スダチチンおよびデメトキシスダチチンの精製品についても抗酸化活性を測定し、他のポリ

*1 食品・応用生物担当, *2 (株) マリン大王,

*3 池田薬草 (株)

フェノールと比較した。

2 実験方法

2・1 試料の調製

(1) スダチ果皮凍結乾燥粉末

スダチ果皮（種子などを除去した搾汁残渣）は2012年にJA徳島市より購入した。スダチ果皮を凍結乾燥（FZ-12, LABCONCO）した後、ミルサー（IFM-700G, 岩谷産業（株））を用いて粉末化した。

(2) スダチ果皮抽出液

スダチ果皮（JA徳島市）を粉砕し、加水した後、酵素処理を行った。酵素を失活させた後、エタノールで抽出し、減圧濃縮した（E-1G）。次に、合成吸着剤を用いて粗精製した後、エタノールで溶解させた（E-2G）。

(3) スダチ果皮エキス末

スダチ果皮抽出液（E-1G および E-2G）をそれぞれスプレードライヤー（L-8, 大川原化工機（株））を用いて粉末化し、S-1G および S-2G を作成した。

2・2 分析方法

(1) スダチチンおよびデメトキシスダチチンの分析

スダチ果皮抽出物を精秤後、遠沈管に入れ、メタノール：ジメチルスルホキシド混液（1:1）3mL、塩酸1mLを加えて70℃で1時間加熱して抽出した。抽出液を10mLに定容し、フィルターろ過した後、高速液体クロマトグラフ（HPLC）（LC-10AVP, (株)島津製作所）を用いてスダチチンおよびデメトキシスダチチンを分析した¹³⁾。分析に用いた標準物質は、当センターにおいてスダチ果皮から分離し、純度95%に精製したものをを用いた¹⁴⁾。

(2) 総ポリフェノールの分析

試料の総ポリフェノール量はフォーリン-チオカルト法により測定した¹⁵⁾。スダチ果皮抽出物をビーカーに精秤し、80%メタノールを50mL加え、20分間攪拌した。ろ過（No.5A）した後、水で100mLに定容し、試料原液とした。水で適宜希釈した試料液500μLにフェノール試薬（2倍希釈）200μL、飽和炭酸ナトリウム溶液500μLを加えた。さらに水を4.3mL加え、室温で1時間反応させた後、765nmの吸光度を分光光度計（UV-1800, (株)島津製作所）を用いて測定した。標準として没食子酸を使用し、試

料中のポリフェノール量を没食子酸換算で表した。

(3) ORAC 法による抗酸化活性測定

スダチ果皮抽出物を1g精秤し、ヘキササン10mLを加え、遠心分離（3,000rpm, 10分）した後、上清を除去した。沈殿に含まれる溶媒を窒素気流下で除去した後、MWA溶液（メタノール：水：酢酸=90：90：9.5：0.5）を10mL加え、37℃で5分間超音波処理した。室温で10分放置した後、遠心分離（3,000rpm, 10分）し、上清を25mLに定容した（親水性画分）。

スダチチンおよびデメトキシスダチチンの精製品については、各試料を5mg精秤し、MWA溶液を加え、5mLに定容した。

得られた親水性画分の抗酸化活性（H-ORAC）を渡辺らの方法¹²⁾に従って測定した。測定には96穴マイクロプレート（Greiner）を用い、蛍光強度の経時変化をインフィニット F200PRO（Tecan）を用いて測定した。H-ORAC値は試料1gあたりのTrolox相当量（μmolTE/g）として示した。

(4) スダチチン量と抗酸化活性の相関性

スダチ果皮抽出物のスダチチン量と抗酸化活性との相関性をピアソンの相関解析を用いて検定した¹⁶⁾。

3 結果と考察

3・1 スダチ果皮抽出物のポリフェノール量

合成吸着剤を用いて粗精製したスダチ果皮抽出液E-2Gは、E-1Gに比べてスダチチン量を約4.5倍に濃縮することができた。これを粉末化したスダチ果皮エキス末S-2Gではさらに約2倍以上濃縮された。デメトキシスダチチンおよび総ポリフェノール量もほぼ同様の倍率で濃縮された（表1）。

3・2 スダチ果皮抽出物等の抗酸化活性

合成吸着剤を用いて粗精製したスダチ果皮抽出液E-2Gは、E-1Gに比べて抗酸化活性が約4倍に増加した。これを粉末化したスダチ果皮エキス末S-2Gではさらに約2倍以上増加した。これはスダチチン量と同様の傾向を示しているため、スダチ果皮抽出物のスダチチン量と抗酸化活性との相関性を検討したところ、相関係数が0.999を示し、極めて強い相関があることが分かった（表2）。

スダチ果皮の抗酸化活性は、リンゴやミカン（ともに可食部（果肉））よりも高く、さらにフクレミカ

ンの果皮 (320 $\mu\text{molTE/g}$)¹⁷⁾との比較でも高値を示した。今後、食用とされる柑橘類の果皮についても測定し、比較検討する必要がある。また、スダチ果汁の抗酸化活性はレモンジュース (12 $\mu\text{molTE/g}$)¹⁸⁾とほぼ同等であることが分かった。

表1 スダチ果皮抽出物のポリフェノール量

	スダチチン (mg/100g)	デメトキシ スダチチン (mg/100g)	総ポリフ ェノール (g/100g)
スダチ果皮 (乾燥粉末)	550	100	1.9
スダチ果皮抽出液			
E-1G	594	128	1.9
E-2G	2,693	542	6.8
スダチ果皮エキス末			
S-1G	896	208	4.7
S-2G	6,060	1,211	17.3

表2 スダチ果皮抽出物等の抗酸化活性

	H-ORAC ($\mu\text{molTE/g}$)
スダチ果皮 (乾燥粉末)	624
スダチ果汁	13
スダチ果皮抽出液	
E-1G	713
E-2G	3,062
スダチ果皮エキス末	
S-1G	1,139
S-2G	6,913
リンゴ*	120
ミカン*	150

* 参考文献 12) より抜粋。可食部 (果肉) の分析値。

3・3 スダチチン精製品の抗酸化活性

スダチチンの抗酸化活性を測定したところ、代表的なポリフェノール成分よりも低値を示した。また、デメトキシスダチチンの抗酸化活性がスダチチンよりも高いことが分かった (表3)。

フラボノイド類の抗酸化活性は、①水素供与基としてのB環の3'位と4'位に水酸基をもつ構造 (カテコール構造) ②4-オキシ基と共役した2,3-二重結合 ③3位と5位の水酸基をもつことが重要とされている¹⁹⁾。カテキンは2,3-二重結合をもたないが、カテコール構造をもつため抗酸化活性が高い。ヘスペレチンは、5位と3'位に水酸基をもつが、2,3-二重結合はもたない。一方、スダチチンは5位と4'位に水酸基をもち、あわせて2,3-二重結合を有しているにもかかわらず、抗酸化活性はヘスペレチンより低かった。構造的な相違としては、ヘスペレチンの3'位にある水酸基が、スダチチンではメトキシ基に置換さ

れ、デメトキシスダチチンでは有していないことがあげられる。また、スダチチンでは、この位置にあるメトキシ基も抗酸化活性に影響を及ぼしている可能性がある。

表3 スダチチン精製品の抗酸化活性

	H-ORAC (mmolTE/g)
スダチチン	10.0
デメトキシスダチチン	16.4
ヘスペレチン*	22.8
(+)-カテキン*	58.9

*参考文献 12) より抜粋。

ノビレチンでは、代謝過程で脱メチル化され、水酸基に置換された代謝物の生理活性の方が高いと報告されている^{20,21)}。このため、水酸基とメトキシ基を両方有するスダチチンおよびデメトキシスダチチンには新たな生理機能性を有する可能性があり、これらの生体内での代謝を含め今後さらに検討する必要がある。

4 まとめ

(1) スダチ果皮をエタノールで抽出し、合成吸着剤を用いて粗精製したスダチ果皮抽出液 (E-2G) のスダチチンおよびデメトキシスダチチン量はスダチ果皮に比べて約4.8倍に濃縮することができた。これを粉末化したスダチ果皮エキス末 (S-2G) ではさらに約2倍以上濃縮された。また、抗酸化活性についても同様の傾向を示した。

(2) スダチチンおよびデメトキシスダチチンの精製品の抗酸化活性を測定したところ、デメトキシスダチチンがスダチチンよりも高いことが分かった。メトキシ基の数が抗酸化活性に影響している可能性がある。

謝辞

スダチチンの精製に関してご協力いただきました徳島大学名誉教授・津嘉山正夫先生に感謝いたします。なお、本研究は、文部科学省・地域イノベーション戦略支援プログラム (グローバル型) の一環として実施した。

参考文献

- 1) 農林水産省生産局園芸作物課. “種類別栽培状況(全国), かんきつ類の果樹”. 農林水産省/特産果樹生産動態等調査. 平成23年産特産果樹生産動態等調査, 2013, http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/.
- 2) Nogata, Y.; Sakamoto, K.; Shiratsuchi, H.; Ishii, T.; Yano, M.; Ohta, H. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2006, 70, p. 178-192.
- 3) Sergeev, I.N.; Li, S.; Colby, J.; Ho, C.T.; Dushenkov, S. Polymethoxylated flavones induce Ca²⁺-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci.* 2006, 80, p. 245-253.
- 4) Saito, T.; Abe, D.; Sekiya, K. Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 357p. 371-376.
- 5) Akachi, T.; Shiina, Y.; Ohishi, Y.; Kawaguchi, T.; Kawagishi, H.; Morita, T.; Mori, M.; Sugiyama, K. Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha (*Citrus depressa*) against D-galactosamine-induced liver injury in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2010, 56, p. 60-67.
- 6) 堀江徳愛, 増村光雄, 奥村重雄. スダチ果皮中の新フラボン(スダチチン). *日化誌.* 1962, 83, p. 465-468.
- 7) Yuasa, K.; Tada, K.; Harita, G.; Fujimoto, T.; Tsukayama, M.; Tsuji, A. Sudachitin, a polymethoxyflavone from *Citrus sudachi*, suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mouse macrophage-like RAW264 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2012, 76, p. 598-600.
- 8) Tsutsumi, R.; Yoshida, T.; Nii, Y.; Okahisa, N.; Iwata, S.; Tsukayama, M.; Hashimoto, R.; Taniguchi, Y.; Sakaue, H.; Hosaka, T.; Shuto, E.; Sakai, T. Sudachitin, a polymethoxylated flavone, improves glucose and lipid metabolism by increasing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutr. Metab.*, 2014, 11, 32.
- 9) 堀江徳愛, 下尾弘茂, 増村光雄, 奥村重雄. デメトキシスダチチン. *日化誌.* 1962, 83, p. 602-604.
- 10) 石川(高野)祐子. 農産物・食品の抗酸化能測定法(酸素ラジカル吸収能(ORAC)法)の妥当性確認. *食品の試験と研究.* 2013, No. 48, p. 19-24.
- 11) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, 山崎光司, 津志田藤二郎. 食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して ORAC 法の有用性と他の測定法との相関性. *化学と生物.* 2009, 47, p. 237-243.
- 12) Watanabe, J.; Oki, T.; Takebayashi, J.; Yamasaki, K.; Takano-Ishikawa, Y.; Hino, A.; Yasui, A. Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Anal. Sci.* 2012, 28, p. 159-165.
- 13) 市川亮一. スダチのスダチチン等ポリメトキシフラボン. 食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル. 産技連/食品健康産業分科会食品機能成分分析研究会. 2011, p. 1-5.
- 14) 津嘉山正夫, 佐々木貴啓, 山本幹二, 河村保彦, 市川亮一. マイクロ波照射によるスダチ搾汁残渣中のフラボン成分の迅速抽出および有用物質への変換. *食科工.* 2010, 57, p. 427-433.
- 15) 金谷健一郎. ポリフェノール類・総量. 新・食品分析法 [II]. (社)日本食品科学工学会食品分析研究会, 光琳, 2006, p. 68-79.
- 16) 柳井久江. ピアソンの相関関係の検定. 4Steps エクセル統計(第3版). オーエムエス出版, 2011, p. 186-189.
- 17) 坂井祥平, 宇津野典彦, 武田文宣, 中川力夫. 県産農産物の機能性成分の調査研究 フクレミカンの機能性成分探索. 茨城県工技セ研報第36号, 2008, p. 25-27.
- 18) Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior, R.L. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, p. 4026-4037.
- 19) 東敬子. フラボノイドの抗酸化メカニズム. 食品機能性の科学. 食品機能性の科学編集委員会, 産業技術サービスセンター, 2008, p. 164-167.
- 20) 矢野昌充. カンキツフラボノイドの発がん抑制作用. 食品機能性の科学. 食品機能性の科学編集委員会, 産業技術サービスセンター, 2008, p.183-184.
- 21) Li, S.; Sang, S.; Pan, M. H.; Lai, C. S.; Lo, C. Y.; Yang, C.S.; Ho, C.T. Anti-inflammatory property of the

urinary metabolites of nobiletin in mouse. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, p. 5177-5181.