

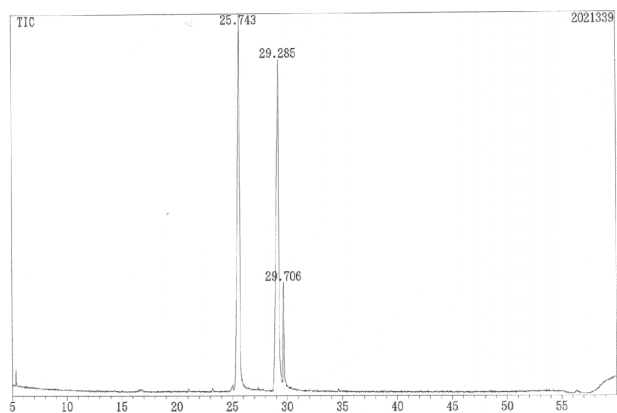


図5 GCMS spectrogram hydrolysis of No.8

以上の結果から、配糖体画分No. 8 は、前記3種類の脂肪酸を非糖部に持つ化合物であることが明らかとなった。

#### 4 まとめ

こいみどりのメタノール抽出画分中の配糖体について検討した。配糖体画分No. 8の分析を行い、非糖部（アグリコン）の構造は、  
パルミチン酸  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$   
 $\alpha$ -リノレン酸  $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}:\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$   
ステアリン酸  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$   
であると判明した。順相シリカゲルクロマトグラフィーで回収した成分の大部分はNo. 8であり、ニガウリに含まれている配糖体の主要成分であると考えられる。

現在、これら配糖体に脂質代謝改善作用があるか確認していない。しかし、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸を含むガラクトシルグリセロール類（糖脂質）に、抗コレステロール作用があるという報告例があり、ニガウリの配糖体は、このような構造をした糖脂質ではないかと推測している。今後、分画した配糖体に脂質代謝改善作用があるか検討を進める予定である。

#### 5 参考文献

- 1) Anura P. Jayasoorina, Masanobu Sakono, *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 331 (2000)
- 2) 柚木崎千鶴子, 河野幹雄：特開2000-93778
- 3) 名取信策, 池川信夫, 鈴木真言：“天然有機化合物実験法” 講談社（1982）
- 4) 伏谷伸宏, 廣田洋：“天然有機化合物の構造解析” シュパ・リンガー・フェラー・東京（1994）

## 桑葉を利用したリキュールの開発\*

岡崎 益己<sup>\*1</sup>・柏田 雅徳<sup>\*2</sup>・水谷 政美<sup>\*2</sup>・工藤 哲三<sup>\*2</sup>・野田 信三<sup>\*3</sup>

Development of Liqueur made from Mulberry Leaves

Masumi OKAZAKI, Masanori KASHIWADA, Masami MIZUTANI, Tetsuzo KUDO  
and Shinzo NODA

桑葉のリキュールへの応用を目的として、桑葉の機能性について検討した。桑葉濃縮液をイオン交換樹脂カラムクロマトグラフ等を用いて分画し、各溶出画分の抗酸化活性、ACE阻害活性及び $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性について比較を行い活性画分を特定した。また、含水エチルアルコール抽出と熱水抽出による各抽出液の各機能性を比較したところ、含水エチルアルコール抽出の方が高く、リキュールへの応用が可能であることを確認した。

キーワード：桑葉、リキュール、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害、1-デオキシノジリマイシン、含水エチルアルコール抽出

#### 1 はじめに

桑葉は高い機能性を持つ天然素材としてその利用が有望視されている<sup>1)</sup>。特に、桑葉の成分として存在する1-デオキシノジリマイシンは、小腸粘膜内の消化酵素である $\alpha$ -グルコシダーゼの働きを阻害する。このことから、桑葉は多糖類から単糖類への分解を抑制し、血糖値の上昇を抑制して、糖尿病や肥満予防に効果があるといわれている<sup>2)</sup>。

桑葉抽出液について、多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフ、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフを用いて分画し、各溶出画分の抗酸化活性（DPPHラジカル消去能）、ACE阻害活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性について検討した。また、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフによる溶出画分について、1-デオキシノジリマイシンの定量を行った。さらに、桑葉の熱水抽出含液と含水エチルアルコール抽出液の抗酸化活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を測定し、桑葉中の機能成分の溶出率の比較を行った。

#### 2 実験方法

##### 2-1 供試試料

桑葉は、トヨタマ健康食品(株)より提供されたものを用いた。

##### 2-2 桑葉の熱水抽出液の抗酸化活性及び $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性

桑葉1.0gを蒸留水100mlに投入し、80℃、20分間加熱抽出したものを吸引ろ過後、100mlに定容して試験液とした。対照として市販緑茶葉を同様に処理して試験液とした。

抗酸化活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の測定は、前報<sup>3)</sup>に従い行った。抗酸化活性の測定には、各試験液を80%エチルアルコール水溶液で5倍に希釈後、0.45 $\mu\text{m}$ のフィルターでろ過して使用した。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の測定には、各試験液を50%ジメチルスルホキシド水溶液で30倍希釈後、0.45 $\mu\text{m}$ のフィルターでろ過して使用した。

##### 2-3 桑葉濃縮液の多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフによる分画及び各溶出画分の機能性評価

桑葉の熱水抽出液のろ液100mlを80℃、2mlまで減圧濃縮し、桑葉濃縮液とした。

\* 発酵食品に関する研究

\* 1 現 延岡保健所

\* 2 応用微生物部

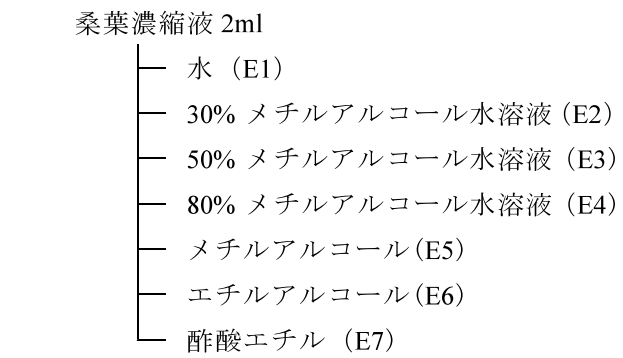
\* 3 トヨタマ健康食品（株）

この桑葉濃縮液 2 mlを用いて、表1に示すフローで多孔質合成吸着樹脂（オルガノ（株）、XAD-2）カラムクロマトグラフによる分画試験を行った。

各溶出画分を用いて抗酸化活性と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。

各溶出画分を70℃で減圧乾固後、水及び80%エチルアルコール水溶液でそれぞれ 5 mlに定容して機能性測定の試験液とした。抗酸化活性の測定と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の測定には、試験液をそれぞれ80%エチルアルコール水溶液、50%ジメチルスルホキシド水溶液で適宜希釈して使用した。

表 1 桑葉濃縮液の分画（XAD-2, 溶出速度：SV3, 溶出量：100ml, 層高さ：150mm,  $\phi$ ：25mm）



#### 2-4 桑葉濃縮液のイオン交換樹脂カラムクロマトグラフによる分画及び各溶出画分の機能性評価と 1-デオキシノジリマイシンの定量

桑葉濃縮液のイオン交換樹脂（H<sup>+</sup>型）カラムクロマトグラフによる分画試験は、表 2 に示すフローで行った。

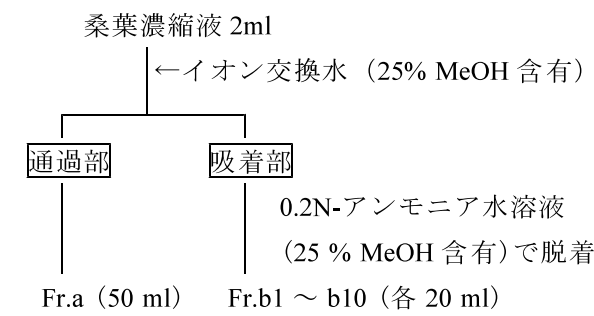
各溶出画分を用いて抗酸化活性、ACE阻害活性及び $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。ACE阻害活性の測定は、前報<sup>3)</sup>に従った。各溶出画分を70℃で減圧乾固後、80%エチルアルコール水溶液で 5 mlに定容して試験液とした。抗酸化活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の測定には、これらの試験液を 2-3 に示す方法で適宜希釈調整して使用した。ACE阻害活性の測定には、試験液をHEPES緩衝液（pH8.3）で適宜希釈して使用

した。

さらに各溶出画分に含まれる 1-デオキシノジリマイシンの含有量をFrit-FAB-LC/MSを用いて測定した。各溶出画分を70℃で減圧乾固後、80%エチルアルコール水溶液で 1 mlに定容して測定用の試料とした。分析条件は次のとおりである。

Frit-FAB-LC/MS：JMS-AX505Wシステム  
マトリックス：4 %グリセリンのメチルアルコール溶液を0.2ml/minの流量でRI出口で追加  
測定モード：正イオンFAB  
カラム：AsahipacNH<sub>2</sub>5EP（ $\phi$ 4.6mm×150mm）  
移動相：アセトニトリル/水=75/25  
流速：0.8ml/min  
検出：R I 検出  
注入量：20  $\mu$ l

表 2 桑葉濃縮液の分画（イオン交換樹脂：H<sup>+</sup>型, 溶出速度：SV3, 層高さ：150mm,  $\phi$ ：25mm）



#### 2-5 桑葉の熱水抽出と含水エチルアルコール抽出により得られた各抽出液の抗酸化活性及び $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性

桑葉の熱水抽出液と含水エチルアルコール抽出液を用いて抗酸化活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の比較を行った。桑葉の熱水抽出は前述の試験液を使用した。桑葉の含水エチルアルコール抽出は、桑葉1.0gを20～50%エチルアルコール水溶液各100mlで60℃、20分間加熱抽出した液をそれぞれ吸引ろ過し、80%エチルアルコール水溶液で100mlに定容して試験液とした。

各試験液を適宜希釈し、抗酸化活性と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。

### 3 結果及び考察

#### 3-1 熱水抽出液のDPPHラジカル消去能及び $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性

DPPHラジカル消去能は、桑葉抽出液が38%であり、緑茶抽出が50%であった。このことから、抗酸化活性は桑葉より緑茶が高いことが分かった。一方、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性は、桑葉抽出液が51%、緑茶抽出液が43%であることから、桑葉の方が緑茶より活性が高いことが分かった。

#### 3-2 桑葉濃縮液の多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフによる分画及び各溶出画分の機能性評価

桑葉濃縮液の多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフにより得られた各溶出画分の抗酸化活性と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を図 1、図 2 に示す。抗酸化活性は、E 3 画分（50%メチルアルコール溶出画分）が最も高い活性を示した。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性は、E 1 画分（水溶出画分）が最も高い活性を示した。

この結果から、桑葉の抗酸化活性成分は極性の低い画分に含まれており、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性成分は極性の大きい画分に含まれていることが明らかとなった。

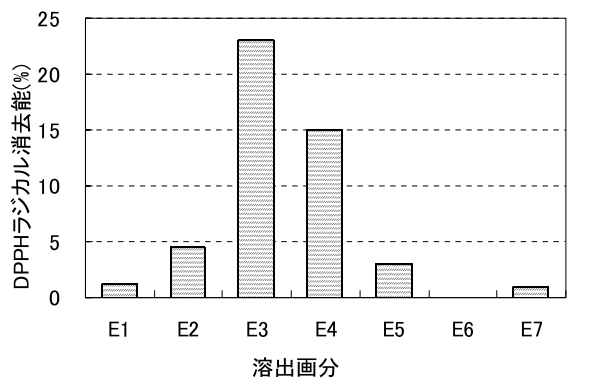


図 1 桑葉濃縮液の多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフ溶出画分の抗酸化活性

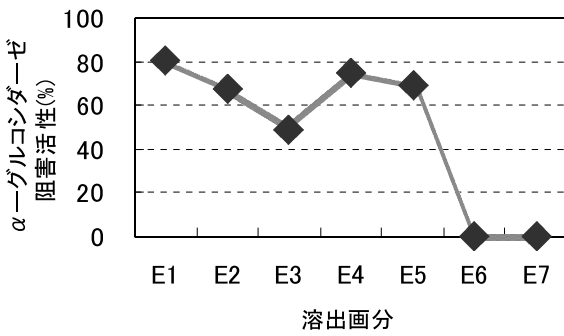


図 2 桑葉濃縮液の多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフ溶出画分の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性

#### 3-3 桑葉濃縮液のイオン交換樹脂カラムクロマトグラフによる分画、及び各溶出画分の機能性評価

桑葉濃縮液のイオン交換樹脂カラムクロマトグラフにより得られた各溶出画分の抗酸化活性とACE阻害活性の測定結果を図 3、図 4 に示す。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の測定結果と 1-デオキシノジリマイシンの定量結果を図 5 に示す。各溶出画分の抗酸化活性、ACE阻害活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を比較したところ、抗酸化活性とACE阻害活性はいずれもFr.a画分（酸性及び中性画分）が最も高く、抗酸化活性が40%、ACE阻害活性が26.1%であった。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性は、Fr.a画分、Fr.b 1 画分（塩基性画分）がそれぞれ57%、54%と高い値を示した。このことにより、抗酸化活性成分及びACE阻害活性成分の大半が酸性または中性成分であるのに対して、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性成分の大部分が塩基性成分であることが示唆された。

また、1-デオキシノジリマイシン（塩基性物質）の定量結果から、Fr.b 1 ～Fr.b 3 画分の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性成分は 1-デオキシノジリマイシンであることが明らかとなった。さらに極性の比較的小さい画分にも $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性が認められることから、1-デオキシノジリマイシン以外の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害成分の存在が示唆された。

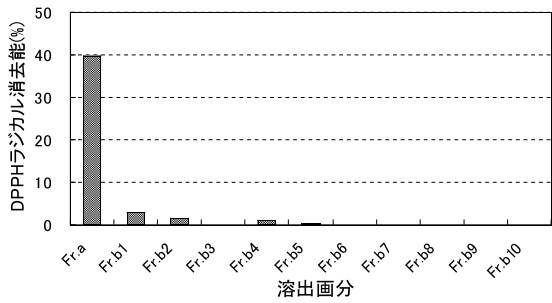


図3 桑葉濃縮液のイオン交換樹脂カラムクロマトグラフ溶出画分の抗酸化活性

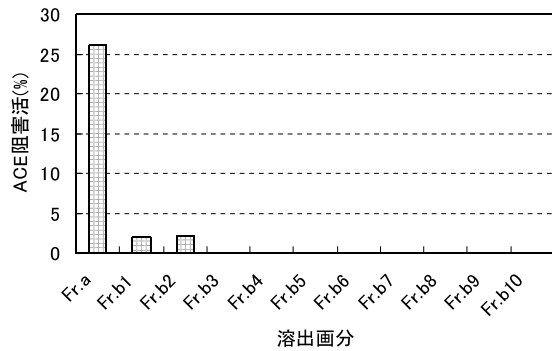


図4 桑葉濃縮液のイオン交換樹脂カラムクロマト溶出画分の ACE 阻害活性

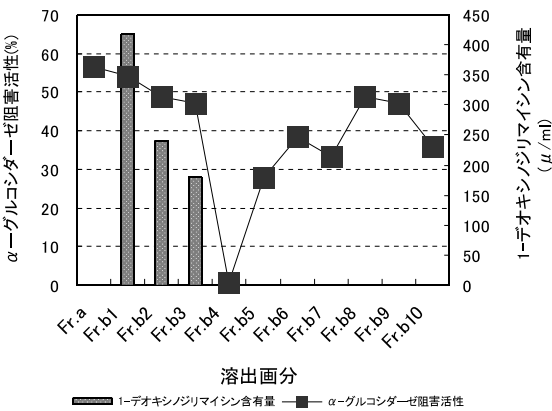


図5 桑葉濃縮液のイオン交換樹脂カラムクロマト溶出画分の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性と 1-デオキシノジリマイシンの定量結果

### 3-4 桑葉の熱水抽出と含水エチルアルコール抽出により得られた各抽出液の機能性評価

桑葉の抽出方法の違いによる抗酸化能、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を比較した。桑葉の熱水抽出と含水アルコール抽出により得られた各抽出液の

抗酸化活性と  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を図 6、図 7 に示す。抗酸化活性は、熱水抽出が35%、50% エチルアルコール抽出が41%であった。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性は、熱水抽出が67%、50% エチルアルコール抽出が77%であった。このことから、抗酸化活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の何れも熱水抽出より含水エチルアルコール抽出の方が高い値を示していることが分かる。また、エチルアルコール濃度の増加に伴い抗酸化活性と  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性が高くなる傾向を示した。3-2の結果より桑葉中の 1-デオキシノジリマイシンが水溶性の極性物質であることから、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有するエチルアルコール可溶性の未知物質の存在が示唆された。

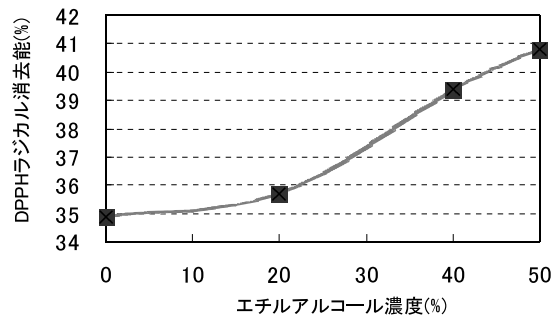


図6 桑葉抽出液のエチルアルコール濃度と抽出液の抗酸化活性

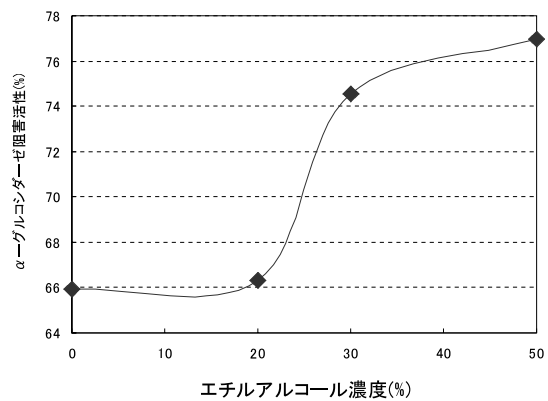


図7 桑葉抽出液のエチルアルコール濃度と抽出液の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性

## 4 まとめ

- 1) 桑葉の抗酸化活性成分は相対的に極性の小さい画分に含まれており、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性成分は比較的極性のある画分に含まれていることが分かった。
- 2) 桑葉の抗酸化活性成分及びACE阻害活性成分の大半は酸性又は中性成分であった。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性成分の大部分が塩基性成分であることが示唆され、その阻害活性成分が1-デオキシノジリマイシンであることが分かった。
- 3) 桑葉の含水エチルアルコール抽出の方が熱水抽出より抗酸化能及び  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性が増加することから、桑葉を用いたリキュール開発の有効性が示唆された。

- 4) 桑葉中には1-デオキシノジリマイシン以外の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性成分が含まれることが示唆された。

## 5 参考文献

- 1) 機能性食品に関する共同研究事業報告, 第1号(神奈川県科学技術政策推進委員会 機能性食品共同研究プロジェクトチーム 1992)
- 2) 機能性食品に関する共同研究事業報告, 第2号(神奈川県科学技術政策推進委員会 機能性食品共同研究プロジェクトチーム 1996)
- 3) 岡崎益己, 柏田雅徳, 日高照利, 水谷政美, 工藤哲三, 宮崎県工技センター・食品開発センター研究報告, 46, 143 (2001)