

## 食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成24年 1 月 28 日 受理

産技連/食品機能成分分析研究会 編

[s-food@m.aist.go.jp](mailto:s-food@m.aist.go.jp)

### 水不溶性の柿(カキ)成分乾燥粉末の胆汁酸吸着活性測定法

作成者：岐阜県産業技術センター 専門研究員 横山慎一郎

e-mail: [yokoyama-shinichiro@pref.gifu.lg.jp](mailto:yokoyama-shinichiro@pref.gifu.lg.jp)

石川県立大学 生物資源環境学部食品科学科准教授 松本健司

e-mail: [kmatsu@ishikawa-pu.ac.jp](mailto:kmatsu@ishikawa-pu.ac.jp)

#### 1. 柿について

##### 1. 1 概要

柿は日本を代表する果物であり、18世紀終わりころから、日本から欧米にも伝えられ、学名も *Diospyros kaki* と命名されている。

全国各地で、特色のある様々な品種が栽培され、その栽培技術による品質の高さから、海外でも人気を博しており、年間約 439 トンの柿が、タイ (76%)、香港 (22%) をはじめとしたアジア地域に輸出されている (財務省貿易統計 2009 より)。

しかしその嗜好は、生食を前提とした甘味度の高い甘柿にあり、脱渋加工が必要とされる渋柿の市場開拓はなされていない。

著者らは、岐阜発祥の渋柿として、国内外にブランド力の高い「蜂屋」の、未成熟摘果 (図 1-1) の乾燥粉末 (図 1-2) に、他品種に比して高含量の縮合型タンニンが含まれることを、「食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル」の「水不溶性柿成分乾燥粉末中の縮合型タンニン含有量測定法」でも報告しており、これまでも、こうした柿加工食品の海外展開に貢献すべく、その特徴に裏付けされた食機能について、国内外に情報発信してきた。

##### 1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

柿の食機能性成分として、 $\beta$ カロテンの抗酸化作



図 1-1 未成熟蜂屋柿果実

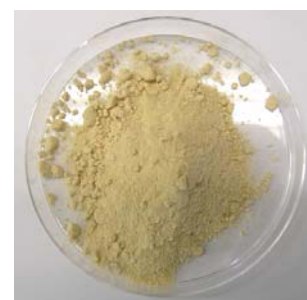


図 1-2 柿未成熟果乾燥粉末 (蜂屋、八尋産業㈱から提供)

用の他、近年では、同じくカロテノイドの一種である $\beta$ クリプトキサンチンの発がん抑制作用に注目が集まっている。近年著者らは、柿未成熟果の乾燥粉末摂取が、血中コレステロール低減効果を示すこと、この効果は高コレステロール血症患者に処方されるコレスチラミンといった陰イオン交換樹脂系の胆汁酸排泄促進薬とそのメカニズム（胆汁酸を吸着し排泄する）が共通していること<sup>1)</sup>、その活性は縮合型タンニンにあること<sup>2)</sup>を報告している。

#### <引用・参考文献>

1. K.Matsumoto, S.Yokoyama and N.Gato, *Phytother. Res.*, 24, p205-210 (2010)
2. K.Matsumoto et al, *Phytother. Res.*, 25, p624-628 (2011)

## 2. 定量分析の方法について

水不溶性柿未成熟果乾燥粉末の製造、および粉末の胆汁酸吸着活性測定法を述べる。

### 2. 1 準備する器具など

1. 電気乾燥庫（静岡製機社製）
2. 脱水機（家庭用洗濯機でよい）
3. ミルミキサー（大阪ケミカル社製）
4. インキュベーター（37℃に保てるもの）
5. 回転式振とう器（アズワン社製マイクロチューブローテーターなど）
6. 分光光度計（560nmの波長が測定できるもの）

#### [試薬]

1. DMSO（特級）
2. コール酸（MW=408.57、純度 $\geq$ 98%、Sigma社製など）
3. リン酸緩衝生理食塩水（PBS、pH7.3）
4. コレスチラミン（ポジティブコントロール）（Sigma社製など）
5. セルロース（ネガティブコントロール）（Sigma社製など、400mesh程度）
6. 胆汁酸測定キット（総胆汁酸-テストワコー、Code 431-15001、和光純薬社製）  
\*キット内容の内、酵素剤、盲検用酵素剤、反応停止液を使用

### 2. 2 分析用試料の前処理・調製方法

1. 6-8月に得られる緑色の果皮を有する直径6cm以下の柿果実のヘタを除き、皮ごと厚さ3mm程度のスライス状に裁断し、60℃で8時間温風乾燥させる。
2. 得られた柿果実乾燥物を洗濯ネットに入れ、流水（室温）中で30分間浸漬・水洗し、水溶性画分を除去する。
3. 水洗した上記柿果実を家庭用洗濯機で5分間脱水し、再度60℃で8時間温風乾燥させる。
4. 乾燥した上記柿果実をミルミキサーで直径1mm以下の粉末に粉碎し、乾燥粉末試

料とする。

## 2. 3 胆汁酸吸着活性測定法

1. コール酸を 200mM (1.63g/20mL) となるよう DMSO に溶解する。
2. 上記コール酸溶液を PBS で 50 倍 (4mM) に希釈する\*。
3. 上記希釈コール酸溶液を PBS で適宜希釈し、0、100、200、300、400、および 500  $\mu$ M の標準液を作成する。
4. 上記標準液 0.2mL および酵素液 0.5mL をよく混和し、37°C で正確に 10 分間加温する (本検)。酵素液の代わりに盲検用酵素液を添加したものについても同様に反応させる (盲検)。
5. 反応停止液 0.5mL を添加し、よく混和した後 120 分以内に、560nm における吸光度を測定し、本検と盲検の吸光度の差値を求め、この値と標準液濃度の相関から検量線を作成する。
6. 2mL チューブに 15mg 乾燥粉末試料を正確に測りとり、50 倍希釈コール酸溶液 (4mM コール酸溶液) を 1,485  $\mu$ L 添加する (最終濃度 1% w/w)。
7. 回転式振とう器振を用いて、37°C で、溶液がしっかり攪拌される速度にて 10 分間反応後、遠心分離 (15,000rpm、5min) により上清を回収し、胆汁酸測定用試料液とする。
8. 標準液同様、胆汁酸測定用試料液 0.2mL および酵素液 0.5mL をよく混和し、37°C で正確に 10 分間加温する (本検)。酵素液の代わりに盲検用酵素液を添加したものについても同様に反応させる (盲検)。
9. 反応停止液 0.5mL を添加し、よく混和した後 120 分以内に、560nm における吸光度を測定し、本検と盲検の吸光度の差値を求める。
10. 得られた試料液の吸光度の差値から、検量線より試料液値を算出し、以下の計算式にて胆汁酸吸着率を求める。

$$\text{式 1 : 胆汁酸吸着率 (\%)} = (500 - \text{試料液値}) \mu\text{M} / 500 \mu\text{M} \times 100$$

11. 各試料液につき 2 回ずつ試行し、その平均値を求める。

\* 食後の小腸内の胆汁酸濃度は 2-10mM である (Northfield, T.C., & McColl, I. *Gut*, 14, p513-518 (1973).)。

## 3. 分析例

### 3. 1 種々の品種の柿未成熟果乾燥粉末による胆汁酸吸着活性の分析例

コール酸の検量線 (0-500  $\mu$ M) から胆汁酸測定用試料液中の未吸着のコール酸濃度を算出する。添加濃度との差により吸着量を求め、これより吸着活性を百分率で表示する。図 4-1 に種々の品種の水不溶性柿未成熟果乾燥粉末による胆汁酸吸着活性を示す。蜂屋柿未成熟果乾燥粉末の胆汁酸吸着活性が最も高いことがわかる。

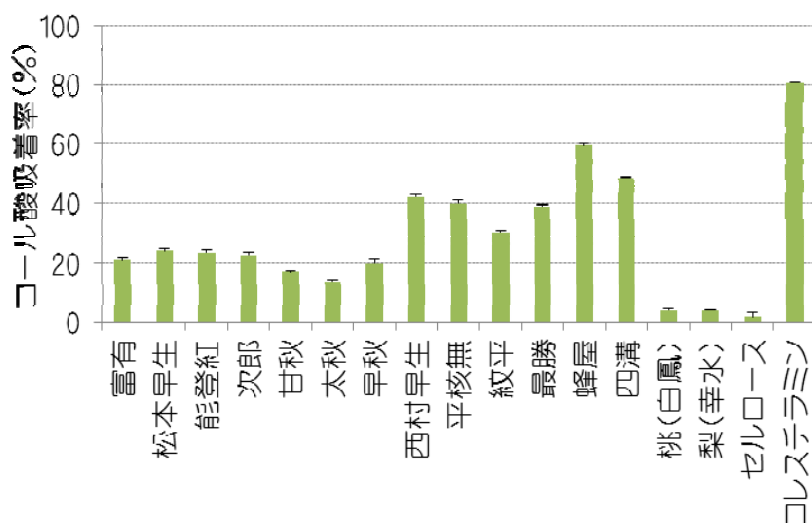


図3-1 種々の品種の柿未成熟果乾燥粉末による胆汁酸吸着活性分析例

#### 4. 分析上の留意、注意点

ここで示したデータは一例であり、胆汁酸吸着活性については、気候や摘果の時期による影響を受けるものと思われる。

本胆汁酸吸着活性測定法は不溶性物質を対象とした評価法であり、水溶性成分の活性は測定できない。

胆汁酸吸着活性測定において、水溶性物質を含有するサンプルは、水または PBS で洗浄し、水溶性成分を予め除く必要がある。

#### 5. その他

水不溶性柿成分乾燥粉末の胆汁酸吸着活性は、主として縮合型タンニンによるものであるが、本法はその他の食品中水不溶性成分の当該活性測定にも適用可能である。

胆汁酸として、コール酸の他、タウロコール酸やグリココール酸を用いても、同様な分析が可能である。

#### 6. 定量法に関する引用・参考文献

1. K. Takekawa and K. Matsumoto, Nat. Pro. Res., In press (DOI: 10.1080/14786419.2011.650640)

-以上-