

平成 17 年度 卒業研究論文

ユズ種子中の各種リモノイド類の分離分析
及び生理活性作用の評価

生命工学技術科 機器分析専攻 3 班

034-0044 亀田

034-0092 豊間根

034-0078 大司

034-0122 前田

担当教官 南澤 磨優覽

ユズ種子中の各種リモノイド類の分離分析及び生理活性作用の評価

私達はグリーンケミストリーとゼロエミッションの観点から植物バイオマスの一つであるユズを余すことなく活用するための方法やシステム構築を検討した。昨年までに私たちのコースでは、レモンやユズ残渣の食物繊維を用いた低コストで環境に優しい重金属吸着剤の合成に成功し、さらに種から抽出したシードオイルの抗酸化能を示唆した。本年度はシードオイル搾汁後の残渣にも注目し、より詳細な検討を行った。

ユズは日本では古くから食品、香料、漢方として親しまれてきた。近年、ユズ中のビタミン類やリモノイド類が活性成分として注目されている。リモノイドには脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体が存在し、いずれも種子中に多く含まれている成分である。脂溶性成分中のリモニンやノミリンなどのアグリコンには抗酸化作用や抗がん作用があることが報告されているが、水溶性の配糖体に関する研究報告はまだ多くない。そこで、我々は配糖体に関する化学的な性状を得るために、詳細な抽出分離条件や、*in vitro* での各種活性試験を試みた。

抽出手順はまず、種を細かく砕き、ヘキサンでオイル分を除き、アグリコンと配糖体をアセトンとメタノールで抽出した。抽出したアセトン層とメタノール層をエバポレートして乾固し、ジメチルクロライドと水(1:1)でさらに抽出し、アグリコンと配糖体に分離した。これらをHPLCとTLCを使って定性した。配糖体は¹H-NMRで糖の存在を確認した。そして抽出した配糖体をSOD様活性作用試験、過酸化水素消去作用試験、DPPHに対するラジカル消去作用試験、チロシナーゼ阻害活性作用試験の4項目について評価した。

その結果、配糖体にはリモニンよりも高い活性がみられ、それは高い抗酸化力があると知られている羅漢果にも匹敵するものであった。今後、配糖体の食品や医薬品への応用が大いに期待される。

The Separation of Citrus Lemonoids in Yuzu Seed, And its Anti-Oxidative Characteristics.

A yuzu has been utilized as a food, a flavor, an aroma and a medicine in Japan for over a thousand years. From the viewpoint of Green-Chemistry and Zero-Emission, we noticed the yuzu residue remained after drinking as plant biomaterial. One of the works was the development of the lemon and the yuzu gels synthesized from a plant biomass residue.

In this year, we investigated the biological activity of citrus limonoid in the yuzu seed, which has not been reported so much.

The limonoid aglycones and limonoid glucosides in the yuzu seed were separated by means of a thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) and the substances purified were characterized by use of $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ ($^1\text{H-NMR}$).

Seed meals were washed with n-hexane to remove oily materials and then the limonoid aglycones and limonoid glucosides in the residue were extracted with acetone following with methanol. After the acetone and methanol was evaporated off, the residue was washed with methylene chloride (CH_2Cl_2) - water (1:1). By this solvent extraction, the water - soluble and hydrophobic species were obtained into water and CH_2Cl_2 phases, respectively. These fractions were separated and the substances in the each fraction were quantified by the HPLC and the silica gel TLC. Then, the bioactivity such as of SOD activity, hydrogen peroxide inhibitory effect, radical erasure action for DPPH and tyrosinase inhibitory effect, were investigated regarding the extracts obtained.

The water soluble fraction was found to contain a glucose by use of HPLC, TLC and $^1\text{H-NMR}$, and hence the water soluble fraction was identified to be glucoside. Through the bioactivity evaluation *in vitro* described above, the bioactivity of glucosides was found to be higher than that of aglycones (hydrophobic species limonoid) and to be comparable to that of Luo Han Guo carrying high activity.

From these results, the great potential of the limonoids in the yuzu seed are expected as a functional material having the biological activity effects.

目次

1. 序論
2. 試薬・機器・器具
 - 2-1 使用した試薬
 - 2-2 使用した機器
 - 2-3 使用した器具
3. 実験
 - 3-1 ヌズ種子抽出物分離操作方法
 - 3-1-1 水性成分 (glucoside) と油性成分 (aglycone) の分離
 - 3-2 ヌズ種子抽出物の各種同定分析測定条件
 - 3-2-1 HPLC 測定条件の決定
 - 3-2-2 TLC 測定条件の決定
 - 3-3 ヌズ種子抽出物の各種活性評価
 - 3-3-1 SOD 様活性作用試験 (NBT 法) の操作手順
 - 3-3-2 過酸化水素消去試験の操作手順
 - 3-3-3 DPPH に対するラジカル消去作用試験の操作手順
 - 3-3-4 チロシナーゼ阻害活性測定操作の作手順
4. 結果
 - 4-1 ヌズ種子抽出物の分離結果
 - 4-2 各種抽出成分の分析結果
 - 4-2-1 HPLC 測定結果
 - 4-2-2 TLC 測定結果
 - 4-3 抗酸化作用について
 - 4-3-1 抗酸化作用とは
 - 4-3-2 標準物質について
 - 4-4 ヌズ種子抽出物の各種活性評価の結果
 - 4-4-1 SOD 様活性作用試験 (NBT 法)
 - 4-4-1-1 NBT 法の原理
 - 4-4-1-2 SOD 様活性作用試験結果
 - 4-4-2 過酸化水素消去試験
 - 4-4-2-1 過酸化水素消去試験の原理

- 4-4-2-2 過酸化水素消去試験結果
- 4-4-3 DPPH に対するラジカル消去作用試験
 - 4-4-3-1 DPPH に対するラジカル消去作用試験の原理
 - 4-4-3-2 DPPH に対するラジカル消去作用試験結果
- 4-4-4 チロシナーゼ阻害活性測定
 - 4-4-4-1 チロシナーゼ阻害活性測定 of 原理
 - 4-4-4-2 チロシナーゼ阻害活性測定結果
- 5. 考察
- 6. 個人考察
- 7. 参考文献
- 8. 謝辞
- 9. 付録
 - 生理活性測定データ

1. 序論

現在私たちの生活は石油製品を使った生活に支えられている。この化石資源の埋蔵量には限りがあり、現在代替材料の研究が盛んに行われている。そこで私たちのコースでは昨年までに植物バイオマスを用いたジュース搾汁後のレモンやユズ残渣の食物繊維を用いて低コストで環境に優しい重金属吸着剤の合成に世界で初めて成功し、その研究成果が大きく評価された。本年度は繊維だけでなく、未利用部位の種の活用方法も検討することにした。

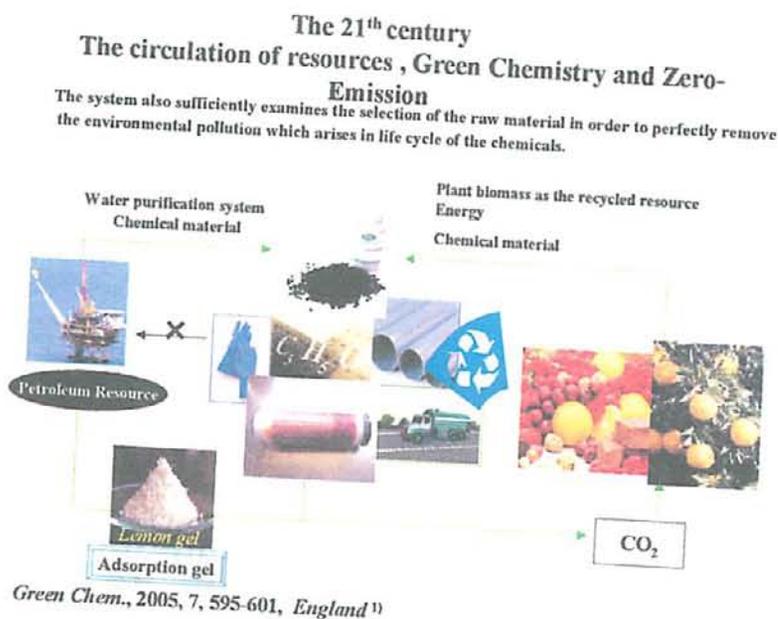


Fig.1 Green Chemistry and Zero-Emission

ユズは古来からアジア圏で親しまれている柑橘類の一つで、我が国でもその歴史は古く、漢方、薬味、柚子湯などとして愛用されてきた²⁾。ユズの果汁は健康食品系ジュースとして使用されており、最近では果汁自体を発酵させた one-pot 合成によるアルコール飲料が開発され話題となった³⁾。果皮は多くの芳香成分やペクチン質を含むことから精油や香味材料としても活用されているが、そのほとんどは廃棄されている。そこで私たちはグリーンケミストリーとゼロ・エミッションの観点からユズを余すことなく活用するためのトータルシステム構築のため、残りの皮や種も余すことなく機能化する方法を検討し、昨年種から抽出したオイルの抗酸化作用を示唆した⁴⁾。そこで本年度はシードオイル搾汁後の残渣に注目した。ユズ中にはビタミン類やリモノイド類が多く含まれ、近年活性成分として注目されている。リモノイド中には脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体が存在し、いずれも種子中に多く含まれている成分である。特に、脂溶性成分中のリモニンやノミリンなどのアグリコンには抗酸化作用や抗がん作用があることが報告されている^{2,5,6,7,8,9)}。一方、水溶性の配糖体に関する研究報告はまだ多くはなく、我々はアグリコンと同様な活性があるのではないかと考え、これらを抽出分離し、*in vitro*での各種生理活性試験を行った。

2. 試薬・機器・器具

2-1 使用した試薬

- アセトン 関東化学株式会社 特級
メタノール 関東化学株式会社 特級
ヘキサン 関東化学株式会社 特級
シクロヘキサン 関東化学株式会社 特級
塩化メチレン 和光純薬株式会社 特級
DMSO 関東化学株式会社 特級
リモニン 和光純薬工業株式会社 生化学用 グレープフルーツ製
ノミリン SIGMA
バイカリン 関東化学株式会社 特級
pH 標準液 BECKMAN
p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 関東化学株式会社 特級
塩酸 和光純薬株式会社 特級
エタノール 関東化学株式会社 特級
酢酸エチル 関東化学株式会社 特級
蟻酸 和光純薬工業株式会社 特級
炭酸ナトリウム 関東化学株式会社 特級
ヘスペリジン SIGMA
ナリンギン SIGMA
Bovine Serum Albumin (BSA) SIGMA
EDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム) 和光純薬工業株式会社
NBT (Nitroblue Tetrazolium) 関東化学株式会社
キサンチン 和光純薬工業株式会社
キサンチンオキシダーゼ (0.236 units / mg powder) 和光純薬工業株式会社
塩化銅 関東化学株式会社 特級
過酸化水素 和光純薬工業株式会社
DA-64 和光純薬工業株式会社 生化学用
TritonX-100
PIPES MERCK
ペルオキシダーゼ (272 units / mg solid) 東洋紡績株式会社
DPPH (1,1-diphtnyl-2-picrylhydrazyl) 和光純薬工業株式会社
メチルエチルケトン 和光純薬工業株式会社 特級
アスコルビン酸 関東化学株式会社 特級
L-チロシン 和光純薬工業株式会社 特級

チロシナーゼ (2130 units / mg solid) SIGMA
リン酸二水素カリウム 和光純薬工業株式会社 特級
リン酸水素二カリウム 和光純薬工業株式会社 特級
焙煎羅漢果 自然治癒力研究所
果汁搾汁後廃棄ユズ (冷凍) 自然治癒力研究所
乾燥ユズ種子 自然治癒力研究所

2-2 使用した機器

ブレンダー HAMILTON BEACH
エバポレーター 東京理科器械株式会社 EYELA (Rotary Vacuum Evaporator N - N
SERIES)
凍結乾燥機 東京理科器械株式会社 (EYELA FDU-2100)
HPLC
COLUMN OVEN CTO-10AS
SYSTEM CONTROLLER SCL-10A
PUMP LC-10AT SHIMADZU
UV-VIS DETECTOR SPD-10A
DIODEARRAY DETECTOR SPD-MIDA
ODS-2 カラム
シリンジ 10 μ l
 ^1H -NMR
分光光度計 島津製作所 UV-1200
チャンバー
ドラフト
ホットプレート
ドライヤー
ウォーターバス
ボルテックス IWAKI TM-251
pHメーター BECKMAN
スターラー ADVANTEC SR100
微量天秤
温度計
タイマー

2-3 使用した器具

安全ピペッター

ピペットマン

チップ

薬さじ

スパーテル

ホールピペット

メスピペット

コマゴメピペット

メスフラスコ

マイクロキャピラリー

メディウムビン

サンプルビン

ネジふた付試験管

噴霧器

スターラーバー

TLCプレート シリカゲル 60 MERCK

ビーカー

三角フラスコ

ナスフラスコ

分液ロート

円座

スタンド

試験管立て

3 実験

3-1 ユズ種子抽出物分離操作方法^{10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20)}

3-1-1 水溶性成分 (glucoside) と油性成分 (aglycone) の分離

<抽出方法>

1. 乾燥させたユズ種子 (今回 298 g) をブレンダーで細かく均一に砕き、ポリタンクへ入れn-ヘキサンを 400 ml 加えて軽く振とう後、一週間常温で静置した。
2. 静置後、ガーゼでヘキサンを濾過し、ナスフラスコに入れエバポレーターで濃縮し、ユズのシードオイルを得た。
3. 濾過後ガーゼに残った残渣を約 50 g ずつ分液ロートにとりアセトンで 50 ml × 10 回抽出・振盪し、アセトン抽出液をエバポレーターで濃縮乾固した。
4. アセトン抽出後残渣を 50 g ずつ分液ロートにとりメタノールで 50 ml × 10 回抽出・振盪し、メタノール抽出液をエバポレーターで濃縮乾固した。
5. アセトン抽出濃縮液を乾固させたナスフラスコに塩化メチレンと蒸留水を 30 ml ずつ加え分液ロートで塩化メチレン層と水層に分離した。
6. メタノール抽出濃縮液を乾固させたナスフラスコに塩化メチレンと蒸留水を 30 ml ずつ加え分液ロートで塩化メチレン層と水層に分離した。
7. 分液した抽出物を移動相 5:5 (メタノール:水) の HPLC (逆相カラム) で分析した。
8. 分液した抽出物を TLC (シリカゲル 60) で分析した。

以上の分離手順をフローチャートにし、以下に記した。(Fig. 2)

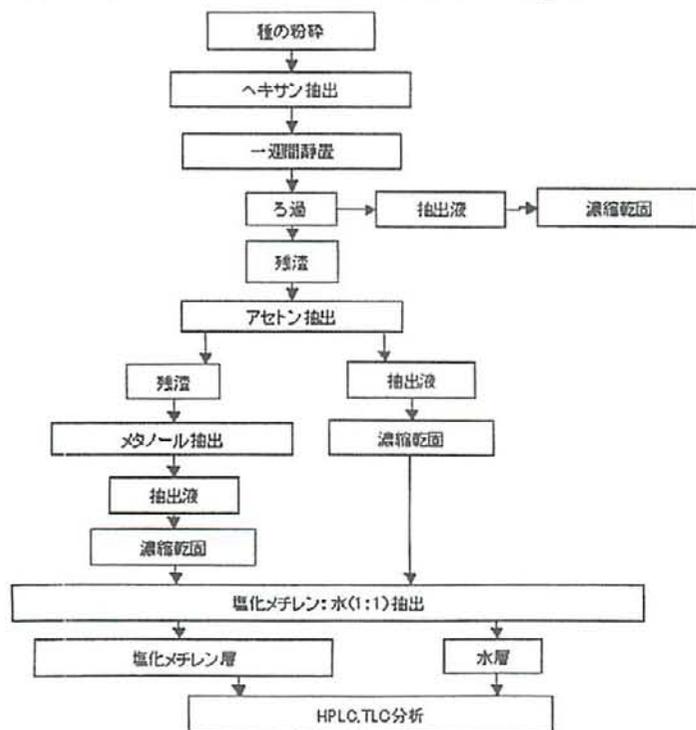


Fig.2 配糖体の分離抽出手順

3-1 ユズ種子抽出物の各種同定分析測定条件⁵⁾

3-2-1 HPLC 測定条件の決定

<移動相の検討>

MeOH : H₂O = 80 : 20

MeOH : H₂O = 60 : 40

MeOH : H₂O = 50 : 50

を検討した。

ODS-2 カラムでユズ種子中の成分（リモニン：ノミリン=1：1混合溶液）を分析し、最もよく分離する移動相を検討した。

<分析条件>

カラム温度：40℃、流速：1.0 ml/min、AUX RANGE：2、REC. RANGE：1、吸光度：190～320 nm、注入量：5 μl

<試料>

抽出したサンプルをそれぞれアセトン、蒸留水、50%メタノールで溶かしたものをHPLCで測定した。

各成分の溶媒への溶解をTable 1に示す。

Table 1 各成分の溶媒への溶解

試料名	メタノール	エタノール	アセトン	ジクロロメタン	水
リモニン	×	×	○(懸濁)	○	—
ノミリン	×	×	○(懸濁)	○	—
ナリンギン	○	○	○	×	—
ヘスペリジン	○	○	○(懸濁)	×	—
アセトン抽出物ジクロロメタン層*	—	○(懸濁)	○	○	×
メタノール抽出物ジクロロメタン層	—	—	—	○	—
アセトン抽出物水層*	○	—	—	—	○
メタノール抽出物水層*	○(少しずつ)	×	×	×	○
アセトン層を冷却し析出した結晶	○(懸濁)	×	×	×	○(90℃)
メタノール層を冷却し析出した結晶	×	×	×	×	○

*室温で潮解性を持つ

3-2-2 TLC 測定条件の決定

<試薬>

リモニン、ノミリン、アセトン抽出物ジクロロメタン層、メタノール抽出物ジクロロメタン層を 100 % ジクロロメタンで溶解した。

アセトン抽出物水層、メタノール抽出物水層、ナリンギン、ヘスペリジンを 100 % メタノールで溶解した。

エーリッヒ試薬（氷中で 100 % エタノール 45 ml に濃塩酸 15 ml 加えた混合溶液に、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1.35 g 加えた。）* 遮光して保冷する。

<展開溶媒>

アグリコン

- (1) シクロヘキサン：酢酸エチル（2：3）
- (2) ジクロロメタン：メタノール（49：1）
- (3) 酢酸エチル：ジクロロメタン（2：3）

配糖体

- (4) 酢酸エチル：2-ブタノン：蟻酸：水（5：3：3：1）

<操作>

1. 展開槽を溶媒で共洗いし、溶媒 100 ml れ、蓋をして溶媒蒸気を飽和させた。
2. 各 20×20 cm のゲルプレートの下端から 2 cm の所に鉛筆で薄く線を引き、等間隔に印を付けた。
3. キャピラリーを用いて試料溶液をスポットした。
4. ドライヤーで乾かしプレートを展開槽の中に入れ、器壁に立てかけ、すぐに蓋を閉め展開した。
5. 溶媒先端がプレートの上から 1 cm の所まで上昇したら溶媒先端に線を引き、プレートを取り出し、ドライヤーで風乾して溶媒を除いた。
6. ドラフト内でプレートにエーリッヒ試薬を噴霧し、塩素ガスが飽和した展開槽に入れ、色をつけた。
7. プレートを引き上げ色の濃いところに丸を付け、Rf 値を計算した。

<計算方法>

Rf 値 = 原点からスポット中心までの距離 / 原点から溶媒先端までの距離

3-3 ユズ種子抽出物の各種活性評価⁴⁾

注) 全ての活性試験の試料濃度 (10 ~ 200 ppm) は各活性作用を測定するための一連の操作を終了した (ex. 試薬と試料まで混合した試験管内の濃度) 試験管中の最終濃度で示してあるため、各試験で試料溶液自体の濃度は異なるので注意する。

3-3-1 SOD 様活性作用試験 (NBT 法) の操作手順

< 試薬 >

- A) 0.05 M Na₂CO₃ 緩衝液 : 炭酸ナトリウム 5.25 g を蒸留水に溶解し、pH メーターで確認しながら 0.1 N 塩酸で pH 10.2 として 1 L にメスアップした。
- B) 8 mM Xanthine 溶液 : Xanthine 45.64 mg を 0.05 M Na₂CO₃ 緩衝液に溶解し、100 ml メスフラスコでメスアップした。(Xanthine は使用後すぐに冷蔵保存し、作った溶液は氷中保存した。(使わないときは冷蔵庫))
- C) 3 mM EDTA 溶液 : エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 111.7 mg を蒸留水に溶解し、100 ml にメスアップした。
- D) BSA 溶液 : Bovine serum albumin 75 mg を蒸留水に溶解し 50 ml にメスアップした。
(泡立ちやすいのでメスアップのときは静かに注意しながら行う。)
- E) 0.75 mM NBT 溶液 : Nitroblue tetrazolium 61.32 mg を蒸留水に溶解し、100 ml にメスアップした。(NBT は使用後すぐに冷蔵保存し、調製した溶液は氷冷中で保存した (使わないときは冷蔵庫) また NBT は過酸化物質なので火気や衝撃に注意すること。)
- F) Xanthine oxidase 溶液 : Xanthine oxidase を秤量ビンに 0.01 g 量って 10 ml にメスアップし、ここからピペットマンで 7 ml 取り、10 ml にメスアップした。この溶液の吸光度が測定操作の空試験で、0.20 ~ 0.23 の範囲に入るようにした。(Xanthine oxidase は使用後すぐに冷蔵保存し、調製した溶液は氷中保存した (使わないときは密閉遮光して冷蔵庫に保存))
- G) 6 mM CuCl₂ 溶液 : 塩化銅 (CuCl₂ · 2H₂O) 102.29 mg を蒸留水に溶解し、100 ml にメスアップした。
- 試料溶液 : 200 ppm … 試料を約 0.155 g 量って蒸留水に溶解し、25 ml メスフラスコでメスアップした。
- 150 ppm … 200 ppm の溶液から 7.5 ml 取って 10 ml にメスアップした。
- 100 ppm … 200 ppm の溶液から 10 ml 取って 20 ml にメスアップした。
- 50 ppm … 100 ppm の溶液から 5 ml 取って 10 ml にメスアップした。
- 10 ppm … 100 ppm の溶液から 1 ml 取って 10 ml にメスアップした。

注) 調製した溶液は全てアルミホイルで遮光し、使用しないときは氷中または冷蔵庫で保存した。

<測定方法>

1. 試験管に A 液を 2.4 ml、B 液、C 液、D 液、E 液をそれぞれ 0.1 ml ずつ入れ、ボルテックスを用いてよく攪拌した。
2. 1 の試験管に St と So には試料溶液 0.1 ml を添加し、Bt と Bo には蒸留水を 0.1 ml 入れてよく攪拌した。
3. これを 25 °C (バットに水を入れて 25°C にセットした。) で 10 分間インキュベートした。
4. 10 分経過後、St と Bt に F 液を 0.1 ml、So と Bo に蒸留水を 0.1 ml 入れよく攪拌し、25 °C で 20 分間インキュベートした。
5. インキュベート後直ちに G 液を加えて反応停止し、分光光度計を用いて測定波長 560 nm で St、So、Bt、Bo の吸光度を測定した。
6. 下記計算式にてそれぞれの抑制率を求めた。

<計算方法>

$$\text{抑制率 (\%)} = \{ 1 - (St - So) / (Bt - Bo) \} \times 100$$

St : 試料溶液の酵素反応後の 560 nm での吸光度

Bt : 空試験溶液の酵素反応後の 560 nm での吸光度

So : 試料溶液の酵素無添加時の 560 nm での吸光度

Bo : 空試験溶液の酵素無添加時の 560 nm での吸光度

3-3-2 過酸化水素消去試験

<試薬>

着色試薬 : PIPES を約 6.047 g 量りビーカーに入れ、少量の蒸留水に溶解し、スターラーで攪拌しながら 1 N NaOH を 20 ml 加え、ここに tritonX-100 を 1 ml、DA-64 を約 0.0076 g 入れ、pH メーターで測りながら、pH が 7.0 になるように 0.1N NaOH を加えた (tritonX-100 は界面活性剤で粘性が高いので、量り取る際には注意する。) ここにペルオキシダーゼ (100 units / ml) 2 ml 入れ、これを 200 ml メスフラスコでメスアップした。(ペルオキシダーゼは酵素なのでできるだけ早く測り、試薬はすぐに冷蔵庫に戻す。また溶液はアルミホイルで包んで遮光し、使わないときは冷蔵庫に入れておく。)

試料溶液 : 抽出した試料を 50 % DMSO 溶液で 10、50、100、150、200 ppm に調製した。

リモニンやノミリンなどの水に溶けにくい試料は 50 % DMSO を用いたが、配糖体などの水に溶ける試料は蒸留水で調製した。(配糖体は 50 % DMSO を用いると固まって溶けにくくなってしまうので蒸留水を用いる。)

200 ppm…試料を約 0.155 g 量って蒸留水に溶解し、25 ml メスフラスコでメスアップした。

150 ppm…200 ppm の溶液から 7.5 ml 取って 10 ml にメスアップした。

100 ppm…200 ppm の溶液から 10 ml 取って 20 ml にメスアップした。

50 ppm…100 ppm の溶液から 5 ml 取って 10 ml にメスアップした。

10 ppm…100 ppm の溶液から 1 ml 取って 10 ml にメスアップした。

標準溶液：過酸化水素を蒸留水で 0.25、0.5、1、2.5、5、10 mM 溶液を調製し、検量線を作成した

調製方法

10 mM…過酸化水素を精密天秤で 0.034 g 量り 100 ml にメスアップした。

5 mM…10 mM 過酸化水素溶液からホールピペットで 50 ml 取り、100 ml にメスアップした。

この 5 mM 溶液から 5 ml 取って 10 ml に調製し、1 mM 溶液とした。さらにこの 1 mM 溶液から 5 ml 取って 10 ml とし、0.5 mM 溶液とした。この 0.5 mM 溶液から 5 ml 取って 10 ml に調製し、0.25 mM 溶液とした。

1.5 mM の過酸化水素標準溶液は、まず精密天秤で 0.51 g 量り、100 ml にメスアップして 15 mM 溶液を作成し、ここから 10 ml 取って 100 ml にメスアップして 1.5 mM とした。

<検量線の作成>

1. 過酸化水素の各濃度の標準溶液をそれぞれ試験管に 10 μ l 取り、蒸留水を 10 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C (ウォーターバスで 37 $^{\circ}$ C にセットした。) で 20 分間インキュベートした。
2. 発色試薬を 5000 ピペットマンで 2.98 ml 量り入れ、37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。
3. 分光光度計にて 727 nm での吸光度を測定し、検量線を作成した。

$$\text{抑制率 (\%)} = \{ 1 - (C - D) / (A - B) \} \times 100$$

<操作手順>

A、B の手順

1. A の試験管に過酸化水素の 1.5 mM 標準溶液を 10 μ l 入れ、さらに蒸留水を 10 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。
2. B の試験管に過酸化水素の 1.5 mM 標準溶液を 2 ml 入れ、さらに蒸留水を 2 ml 加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。
3. A には発色試薬を 5000 ピペットマンで 2.98 ml 加え、さらに 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートし、B は分光光度計で 727 nm での吸光度を測定した。
4. A の 5 分間のインキュベート終了後 727 nm での吸光度を測定した。

C、D の手順

1. 各濃度の C の試験管に過酸化水素 1.5 mM 標準溶液を 10 μ l 入れ、各濃度の試料をそれぞれ 10 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。
2. 各濃度の D の試験管に過酸化水素 1.5 mM 標準溶液を 2 ml 入れ、各濃度の試料をそれぞれ 2 ml 加え 37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。
3. C には発色試薬を 5000 μ l 量取り器で 2.98 ml 加え、さらに 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートし、D は分光光度計で 727 nm での吸光度を測定した。
4. 残った溶液を分光光度計で 727 nm での吸光度を測定した。(D)
5. C の 5 分間のインキュベート終了後 727 nm での吸光度を測定した。
6. A、B、C、D の吸光度を上記計算式に代入し、抑制率を求めた。

A : 標準溶液の発色後の 727 nm での吸光度

B : 標準溶液の発色前の 727 nm での吸光度

C : 試料溶液の発色後の 727 nm での吸光度

D : 試料溶液の発色前の 727 nm での吸光度

3-3-3 DPPH に対するラジカル消去作用試験

<試薬>

1.5 $\times 10^{-4}$ M DPPH methanol 溶液 : DPPH を精密天秤で 0.0118 g 量取り、メタノールで溶解し、200 ml メスフラスコでメスアップした。

(試薬はすぐに冷蔵庫に戻し、調製した溶液はアルミホイルを掛けて遮光し、使わないときは冷蔵保存した。)

試料溶液 : 200 ppm \cdots 試料を 0.8 g 量って蒸留水に溶解し、200 ml メスフラスコでメスアップした。

150 ppm \cdots 200 ppm の溶液から 75 ml 取り、100 ml にメスアップした。

100 ppm \cdots 200 ppm の溶液から 50 ml 取り、100 ml にメスアップした。

50 ppm \cdots 100 ppm の溶液から 25 ml 取り、50 ml にメスアップした。

10 ppm \cdots 100 ppm の溶液から 10 ml 取り、100 ml にメスアップした。

<方法>

1. 試験管に 1.5 $\times 10^{-4}$ M DPPH methanol 溶液を 5 ml メスピペットで 3 ml 入れ、同様に試料溶液を 3 ml 入れて密栓し、ボルテックスでよく攪拌し、30 分間放置した。
2. 30 分放置後分光光度計で 520 nm での吸光度を測定し、ブランクとの吸光度の差を測定値として、下記計算式により消去率を求めた。

<計算方法>

$$\text{DPPH 消去率 (\%)} = \{ A - (B - C) \} / A \times 100$$

A : 1.5×10^{-4} M DPPH methanol 溶液の 520 nm での吸光度

B : 試料溶液の 520 nm での吸光度

C : 試料溶液とメタノールの等量混合溶液の 520 nm での吸光度

3-3-4 チロシナーゼ阻害活性測定

<試薬>

1/15 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8)

: リン酸二水素カリウムを精密天秤で 68.045 g 量り取り、超純水 500 ml で溶解し 1 M とした (Stock A 液)。同様にリン酸水素二カリウムを 87.09 g 量り取り、超純水 500ml に溶解し、1 M 溶液とした (Stock B 液)。これらを 1/15 に希釈し、等量ずつ混ぜて pH を調整して 1/15 M リン酸カリウム緩衝液とした。(pH の調整は、溶液をスターラーで攪拌しながら pH メーターで pH を測定し、pH 6.8 より高い場合は 1 M リン酸二水素カリウムで、低い場合は 1 M リン酸水素二カリウムを少しずつ加え、pH を調整した。)

0.01 % (w/v) L-チロシン溶液: チロシンを精密天秤で 10 mg 量り取り、1 N NaOH を 2 ml 駒込ピペットで 5 ~ 10 滴で溶解し、作製した 1/15 M リン酸カリウム緩衝液で 100 ml にメスアップした。(アルミホイルを巻いて遮光し、氷中保存した。)

チロシナーゼ溶液: チロシナーゼ 2.4 mg を 1/15 M リン酸カリウム緩衝液で溶解し、100 ml にメスアップした。

試料溶液: 200 ppm 試料を約 0.2 g 量って蒸留水に溶解し、25 ml メスフラスコでメスアップした。

150 ppm...200 ppm の溶液から 7.5 ml 取り、100 ml にメスアップした。

100 ppm...200 ppm の溶液から 10 ml 取り、20 ml にメスアップした。

50 ppm...100 ppm の溶液から 5 ml 取り、10 ml にメスアップした。

10 ppm...100 ppm の溶液から 1 ml 取り、10 ml にメスアップした。

<操作手順>

1. 試験管にサンプルを 50 μ l (コントロールはサンプルの代わりにエタノールを 50 μ l)、0.01 % (w/v) L-チロシン溶液 1 ml、1 / 15 M リン酸カリウム緩衝液 45 ml、チロシナーゼ溶液 500 μ l (ブランクはチロシナーゼ溶液の代わりに 1 / 15 M リン酸カリウム緩衝液を 500 μ l) 入れて攪拌した。
2. 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。
3. インキュベート後直ちに 475 nm おける吸光度を測定し、下記計算式により吸光度を策定した。

$$\text{阻害率 (\%)} = 1 - (\text{St} - \text{Sb}) / (\text{Ct} - \text{Cb}) \times 100$$

St : サンプルのテスト (チロシナーゼ添加) の吸光度

Sb : サンプルのブランク (チロシナーゼ無添加) の吸光度

Ct : コントロール (サンプルの代わりにエタノール添加) の吸光度

Cb : コントロールのブランク (チロシナーゼ無添加) の吸光度

4 結果

4-1 ユズ種子抽出物の分離結果

今回の抽出操作で配糖体の分離できた。この抽出手順ではヘキサン、アセトン、メタノールの順に抽出していき、最後にジクロロメタン：水（1：1）混合溶液で最終的にアグリコンと配糖体に分けていく。この手順は論文を参考に行った手順で、この溶媒の順番に抽出していくのは極性の無いものから徐々に極性を上げていき、始めにオイル分を取り除いて配糖体を得やすくするためだと考えられる。この抽出手順で、前の溶媒から次の溶媒に移る際（ヘキサンからアセトンまたはアセトンからメタノール）に前の溶媒が取り除ききれていないとジクロロメタン：水（1：1）で分ける時に中間層が出来てしまい、上手く分離できなかったため、分液操作をしっかりと行い、次の溶媒の1回目か2回目までは別にしておいた方がいいと思う。また、ジクロロメタン：水（1：1）で分ける前にアセトン層及びメタノール層はエバポレートするが、このとき熱をかけすぎたりすると配糖体の変性してしまう可能性があるため温度や酸の混入には注意が必要である。今回参考にした論文ではアセトン層に50%のアグリコンが、メタノール層に残りのアグリコンと全ての配糖体がくると記述されていた。しかし、抽出手順の途中で偶然に結晶として析出したものがあり、これはHPLCで分析した結果純度が高いことが分かったため、今後はこれらの結晶が多く得られるような抽出方法の確立が必要である。また、純度が高いといっても、最低4成分は含まれているので、単品にして構造を解析しなければならない。今回は定量まではしていないので、今後は定量して論文の記述と比較し、さらに回収率を求めることも必要だろう。

4-2 各種抽出成分の分析結果

4-2-1 HPLC 測定結果

<移動相の検討>

移動相の検討を行った。移動相については、MeOH : 水について、80 : 20 から 50 : 50 までの計 4 つの移動相を検討した。

その結果 MeOH : 水 = 80 : 20 ~ 60 : 40 で測定した場合ピークが重なってしまい、MeOH : 水 = 50 : 50 が最も良く分離したので、これに決定した。

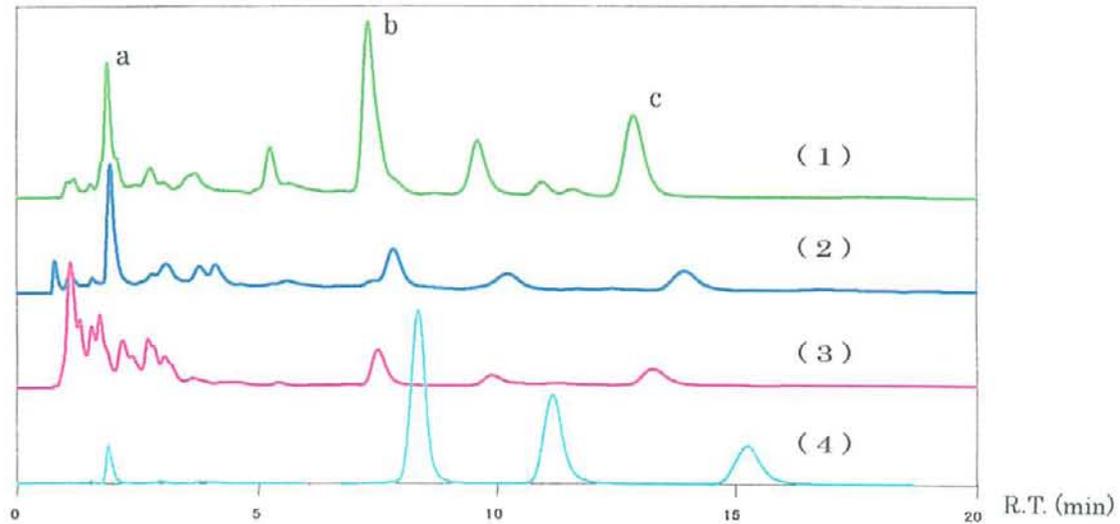


Fig.3 HPLC chromatograms of aglycones using ODS-2 columns

- (1) アセトン抽出 ジクロロメタン層 (3) アセトン層を冷却し析出した結晶
(2) メタノール抽出 ジクロロメタン層 (4) アセトン層を濃縮し析出した結晶

^a acetone, ^b limonin, ^c nomilin

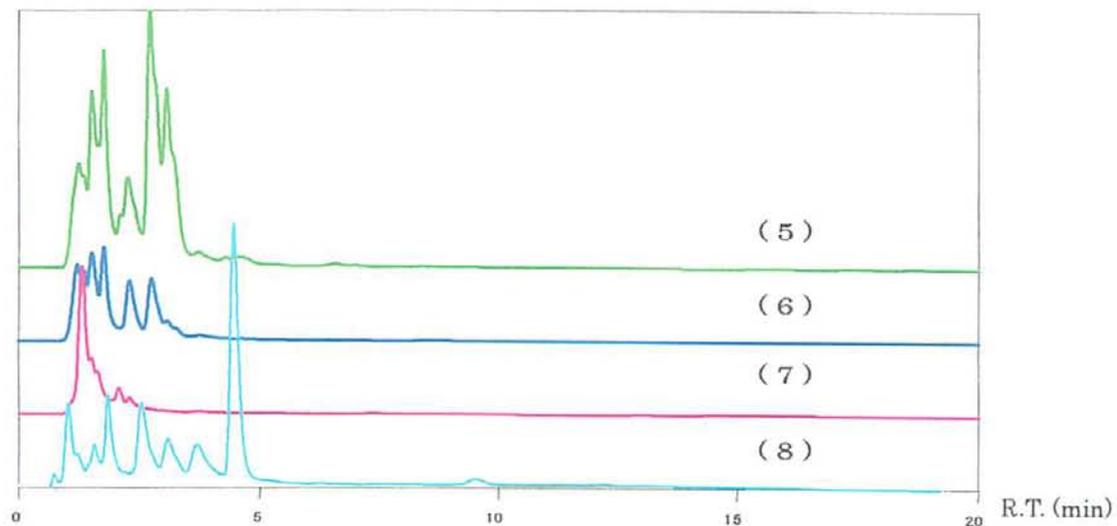


Fig.4 HPLC chromatograms of aglycones using ODS-2 columns

- (5) アセトン抽出 水層 (7) メタノール層を冷却し析出した結晶
(6) メタノール抽出 水層 (8) 残渣を水に浸けジクロロメタンで分離した水層

逆相カラムを用いて、標準品のリモニンの保持時間は8分、ノミリンは13~14分で確認された。

Fig.3には、リモニンとノミリンが確認された。

Fig.4には、リモニンよりも早い保持時間で溶出される水溶性成分が確認できた。

また、私たちが分離して配糖体としたもの(8)は保持時間が4分前後だったことから、これらは水溶性成分であることが確認できた。

今回の移動相はメタノールと水の比率を変えたものだったので、今後はこれの他に、リン酸緩衝液を入れたアセトニトリルなどでも検討する必要があるだろう。また、カラムもODS-2カラムでしか分離していないので、ゾルゲルカラムやその本数を変えてさらに分離能を上げていくことも重要だと思う。そうすれば、未知成分の単品の分種もできるだろう。

4-2-2 TLC 測定結果

Table 2 Rf values of limonoid aglycones analysed by TLC

リモノイドアグリコン	Rf値		
	展開溶媒		
	1 ^a	2 ^b	3 ^c
リモニン	0.304	0.289	0.492
ノミリン	0.233	0.288	0.533
ナリンギン	-	-	-
ヘスペリジン	-	-	-
アセトン抽出物 ジクロロメタン層	0.900	0.893	0.928
	0.784	0.423	0.751
	0.639	0.327	0.589
	0.569	0.246	0.476
	0.493	0.148	0.299
	0.332	0.096	0.185
	0.283	0.047	
	0.208		
	0.121		
	0.121		
メタノール抽出物 ジクロロメタン層	0.905	0.406	0.781
	0.784	0.332	0.603
	0.719	0.251	0.521
	0.608	0.132	0.473
	0.498	0.057	0.306
	0.292		0.195
	0.248		
	0.206		
	0.122		
	0.122		
アセトン抽出物 水層	-	-	-
メタノール抽出物 水層	-	-	-
アセトン抽出液を冷却し析出した結晶	-	-	-
メタノール抽出液を冷却し析出した結晶	-	-	-

^aCyclohexane-ethyl acetate (2:3).

^bMethylene chloride-methanol (49:1).

^cEthyl acetate-methylene chloride (2:3).

脂溶性成分の展開溶媒は 3 種類、水溶性成分の展開溶媒は 1 種類で検討した。これも論文を参考にした。

展開溶媒 (1) の Rf 値は、リモニン 0.304、ノミリン 0.233、ナリンギン、ヘスペリジンはスポットがなかった。アセトン抽出物 水層、メタノール抽出物 水層は 9 成分確認できた。一番再現性が取れており、文献値とも近く、分離能にも優れていた。

展開溶媒(2)のRf値は、リモニン 0.289、ノミリン 0.288、ナリンギン、ヘスペリジンはスポットがなかった。アセトン抽出物 水層は7成分確認でき、メタノール抽出物 水層は5成分確認できた。再現性が全く取れておらず、文献値ともかなりずれており、分離能もあまりよくなった。これは展開槽に入れるとき斜めから入れてしまったなどの技術的な面も考えられるが展開溶媒(1)では再現性が取れていたのも、溶媒の組成がジクロロメタン:メタノール(49:1)でジクロロメタンの沸点が約40℃と低いことから、準備している間に飛んでしまった可能性も考えられる。今後この組成で行う場合は気化しないように工夫が必要だと思う。

展開溶媒(3)のRf値は、リモニン 0.492、ノミリン 0.533、ナリンギン、ヘスペリジンはスポットがなかった。アセトン抽出物 水層、メタノール抽出物 水層は6成分確認できた。大きくはずれたデータはなかったが文献値とは異なり、分離能も展開溶媒(1)ほどよくはなかった。このことから、今後は展開溶媒(1)で検討していくのが良いと考えられる。

また、ヘスペリジンやナリンギンがエーリッヒ試薬では発色が見られなかったのも、TLCプレート(蛍光入りなど)や二次展開についても検討してみる必要があると思う。

水溶性成分の展開溶媒ではテーリングがひどく、Rf値を求めることはできなかった。

4-3 抗酸化作用について ^{21,22)}

4-3-1 抗酸化作用とは

人間の呼吸代謝は肺で取り込んだ酸素を、細胞がグルコースと反応させてエネルギー変換を行い進行する。この代謝は Fig.5 に示すように非常に多数の化学反応から連なった経路であるが、大きく三つの段階に分けることが出来る。まず一つは、グルコースからピルビン酸までの経路で、これは発酵の EM 経路そのものである。第二は、このピルビン酸を二酸化炭素と水素に完全分解する経路である。この経路は環状をなし、その中で特徴的な、三つのカルボキシル基 ($\cdot\text{COOH}$) を持ったクエン酸が現れるのでクエン酸回路やトリカルボン酸回路 (略して TCA 回路) と呼ばれている。第三の段階はクエン酸回路で収穫した水素から電子を取り出し、それに含まれるエネルギーをしばり出す一種の電子伝達系で

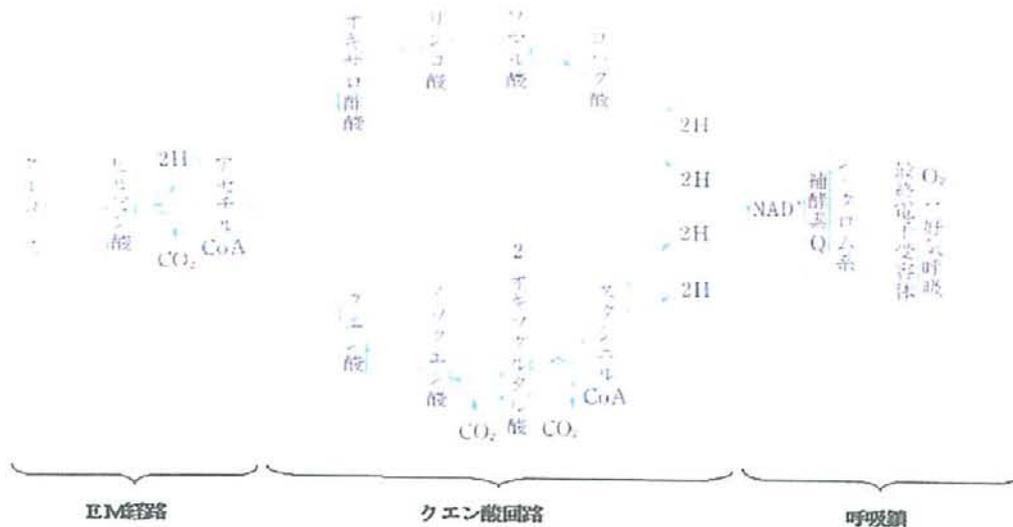


Fig.5 呼吸の全景

ある、呼吸鎖と名づけられている。

この呼吸代謝の際に約 3 ~ 15 % の活性酸素を生じる。それらは殺菌作用を持つ防衛酸素とガンや動脈硬化を引き起こす有害酸素が存在する。

すなわちこれらの部分で行われる細胞のエネルギー代謝によって発生した活性酸素を殺菌作用に利用する有効な反応系や、その攻撃を防ぐ酵素反応システムを保持しているのである。

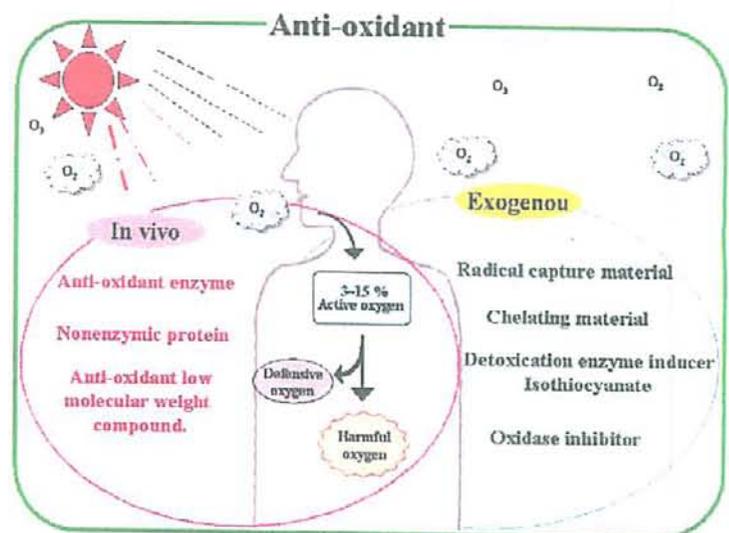


Fig.6 Detoxication

体内で発生する活性酸素には

- ・ スーパーオキシド
- ・ 過酸化水素
- ・ 一重項酸素
- ・ ヒドロキシルラジカル

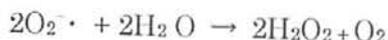
がある。

人が呼吸で吸っている酸素分子は基底状態が三重項状態であり常磁性を示す極めて珍しい分子であり、三重項酸素と呼ばれ反応性はあまり高くない。これは活性酸素には含まれないが空気に長い間さらされたり、体内代謝によって反応性の高い活性酸素と称される酸素種に容易に変換されたりする。

つまりこの三重項酸素が何らかの拍子に他から電子を得ると不対電子を一つもった活性酸素、スーパーオキシドアニオン ($\cdot O_2$) が発生する。



このスーパーオキシドが水分子に働きかけ過酸化水素を生成する系も存在する。



さらに、基底状態の三重項酸素が励起した状態である酸素分子の一重項酸素においては、一組の不対電子が互いの軌道に押し付けあうために、空いた軌道が二個の電子を強く求め、反応性が高くなり次第に他の活性酸素に姿を変える。皮膚が紫外線にあると皮下組織内でよく発生するのはこの代表的な例である。又、同様に発生するヒドロキシルラジカルは、スーパーオキシドや一重項酸素等が更に利動的になるものと考えられ、先に述べた活性酸素よりも更に強い酸化力を有する活性酸素に変化して、タンパク質やDNAを切断したり脂質を過酸化したりする。

人には、これらの有害な活性酸素をスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) やカタラーゼなどの体内酵素で無毒化する解毒システムが備わっている (Fig.7)。

しかし近年では過剰なストレスや電磁波、化学物質、有害ガスの体に与える影響が増加傾向に有り、活性酸素の発生原因が増えていくのと比例してガンや心筋梗塞、脳梗塞などの症例が増加している。

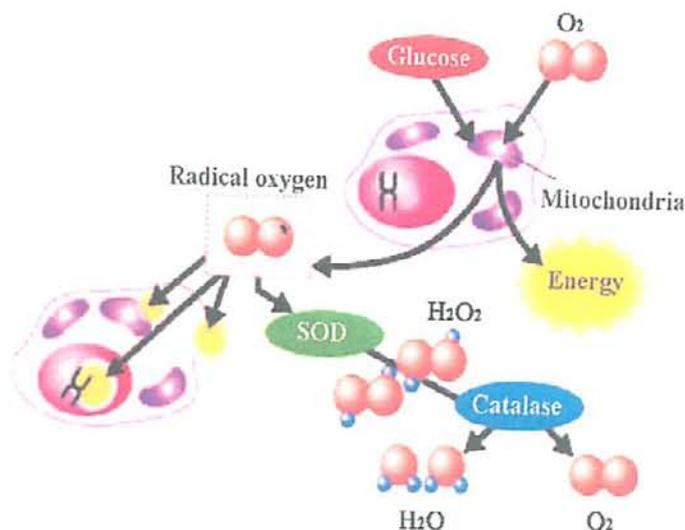


Fig.7 Radical inhibitory effect

この、外的要因による解毒システムへの悪影響を、カロテノイドやフラボノイドなどの食物や薬などを摂取することで抑制できる。すなわち良好な代謝平衡を維持する抗酸化作用である。これら食物は従来、民間での伝承療法や旬の食材として習慣的に用いられた。研究が進み抗酸化成分を含有する食品の摂取が生活習慣予防などに有効であることが分かってきた²⁾。例えば、カロテノイドは緑黄色野菜に含まれる脂溶性物質で一重項酸素に対する消去作用が強く、ポリフェノール類や、フルーツやお茶に多く含まれる水溶性の物質(フラボノイド)で、スーパーオキシドなどのラジカルに対する消去作用が注目されている。

近年、新たにグレープフルーツやグレープの種子から取れるシードオイルにも抗酸化作用があることが注目され、なかでもリモノイド類についての作用が注目され始めている。

我々の注目したゆず種子中のリモノイドにも同様な効果が期待出来、*in vitro*で検討を行った活性試験結果を以下に記す。これらの試験では、脂溶性及び水溶性リモノイドの作用に関する比較検討を本報で初めて報告している。

4-3-2 標準物質について (23,24,25,26)

バイカリン

バイカリンは古くから日本で栽培されるシソ科植物であるコガネバナの根「オウゴン（黄芩）」から抽出される。現在では、SOD 様活性作用や抗アレルギー作用などが認められ、化粧品、漢方薬などへの処方や、活性酸素消去試験の指標として使用されている。

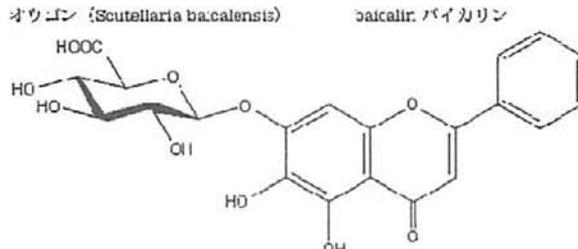


Fig.8 バイカリン

アスコルビン酸

アスコルビン酸は、広く柑橘類や野菜類に存在し、抗壊血病効果を有する酸で、ビタミン C のことである。通常は L 型のことをで、D 型は生理作用を示さない。生体内における主な機能は生理作用として抗酸化作用があり、水溶性ラジカルの捕捉のみならず、ビタミン E などの脂溶性ラジカル捕捉型酸化物の再生にも関与しており、フリーラジカル消去試験などの生理活性作用試験の指標として使用されている。

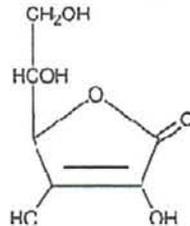


Fig.9 アスコルビン酸

羅漢果

羅漢果は古くから中国で栽培されるウリ科の多年生つる性宿根植物であり、咳止めや胃炎、便秘などの民間薬として使用されている。さらに、モグロシド類と呼ばれる配糖体を含有しておりショ糖よりも強い甘味を持つ。現在では 4 種類の構造が確認され、抗酸化作用や抗アレルギー作用などが多数報告されており、今回はユズ種子中のリモノイド配糖体と比較検討するための指標として使用した。

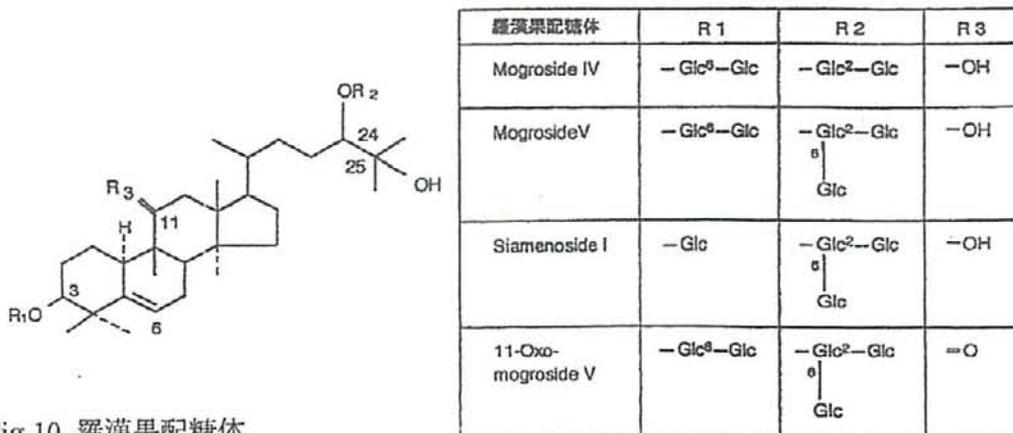


Fig.10 羅漢果配糖体

4-4 ヌズ種子抽出物の各種活性評価の結果

4-4-1 SOD 様活性作用試験 (NBT 法) ²⁷⁾

4-4-1-1 NBT 法の原理

呼吸によって発生されるスーパーオキシドアニオンを SOD (スーパーオキシドディスムターゼ) によって分解する活性能を見る検査で、キサンチンにキサンチンオキシダーゼが作用してスーパーオキシドアニオンが発生する。生成したスーパーオキシドアニオンは共存するニトロブルーテトラゾリウム ($\text{NO}_2\cdot\text{TB}$) を還元し、ジホルマザンを形成するが、反応液中に SOD が存在するとスーパーオキシドアニオンの一部が H_2O_2 と O_2 に不均化され、ジホルマザンの形成が減少する。

したがって、スーパーオキシドアニオンと $\text{NO}_2\cdot\text{TB}$ との反応に基づくジホルマザンの減少程度を、吸光度 560 nm で測定し、標準試薬としてバイカリンを用いて、試料中の SOD 活性値を求める。

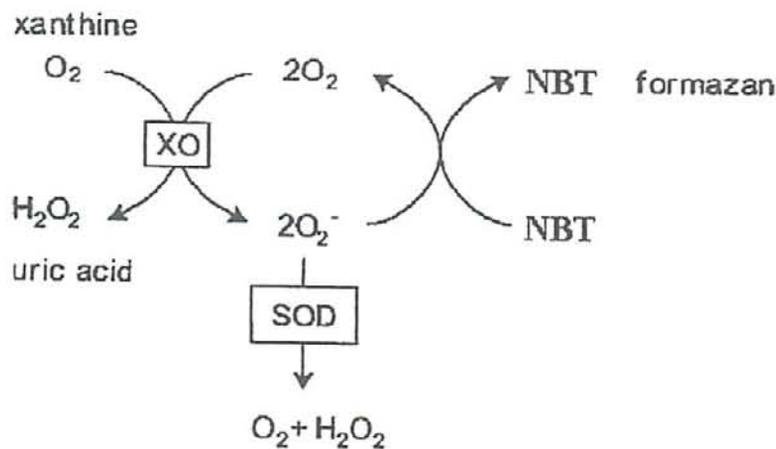


Fig.11 Evaluation of SOD activity

4-4-1-2 SOD 様活性作用試験結果

NBT 法を用い、インキュベート温度は 25 °C、吸光度測定波長は 560 nm、標準物質はバイカリンを用いて行った。Fig.12 に SOD 様活性作用試験のグラフを示し、縦軸は抑制率、横軸はサンプル濃度を示す。

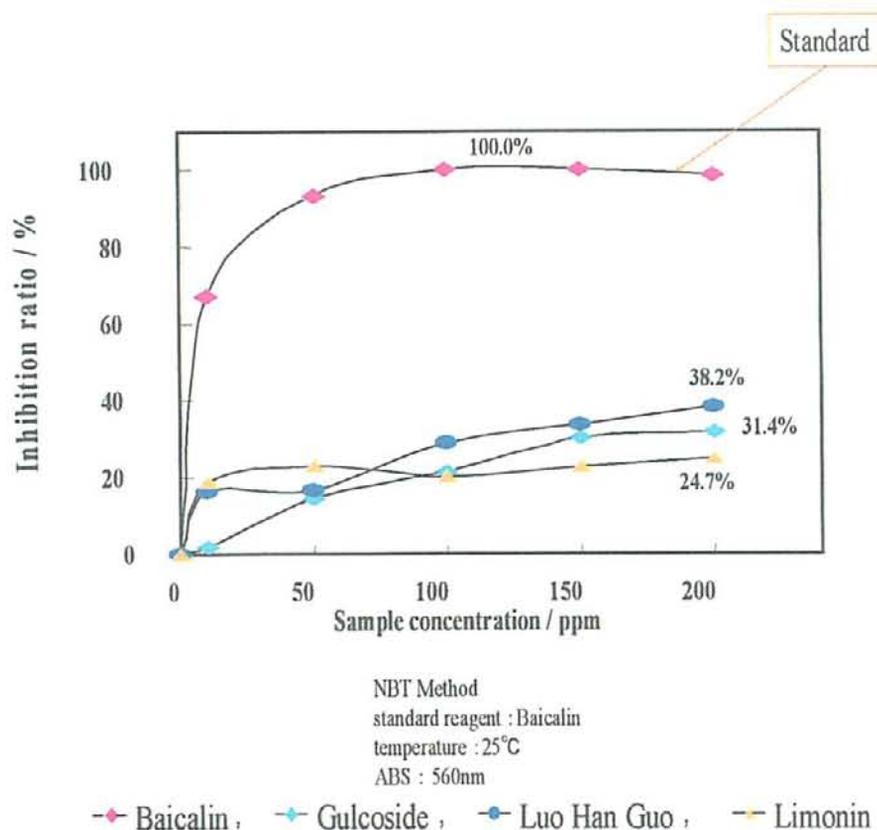


Fig.12 Evaluation of SOD activity

その結果、各サンプルでの抑制率最高値は、バイカリンは 100.0 % (100 ppm, 150 ppm)、羅漢果は 38.2 % (200 ppm)、配糖体は 31.4 % (200 ppm)、リモニン は 24.7 % (200 ppm) であった。カッコ内の数値は抑制率最高値が示されたときのサンプル濃度を示す。

4-4-2 過酸化水素^{25,28)}

4-4-2-1 過酸化水素消去作用試験の原理

SOD がスーパーオキシドアニオンを分解してできた過酸化水素をカタラーゼ（またはペルオキシダーゼ）が触媒として無毒な水と酸素に分解する作用



を過酸化水素の標準溶液を基質とし、標準試薬としてバイカリンを用いて試料による過酸化水素の減少を吸光度 727 nm で測定し、試料中の過酸化水素消去値を求める。

4-4-2-2 過酸化水素消去作用試験結果

インキュベート温度は 37 °C、吸光度測定波長は 727 nm、標準物質はバイカリンを用いて行った。Fig.13 に過酸化水素消去作用試験のグラフを示し、縦軸は抑制率、横軸はサンプル濃度を示す。

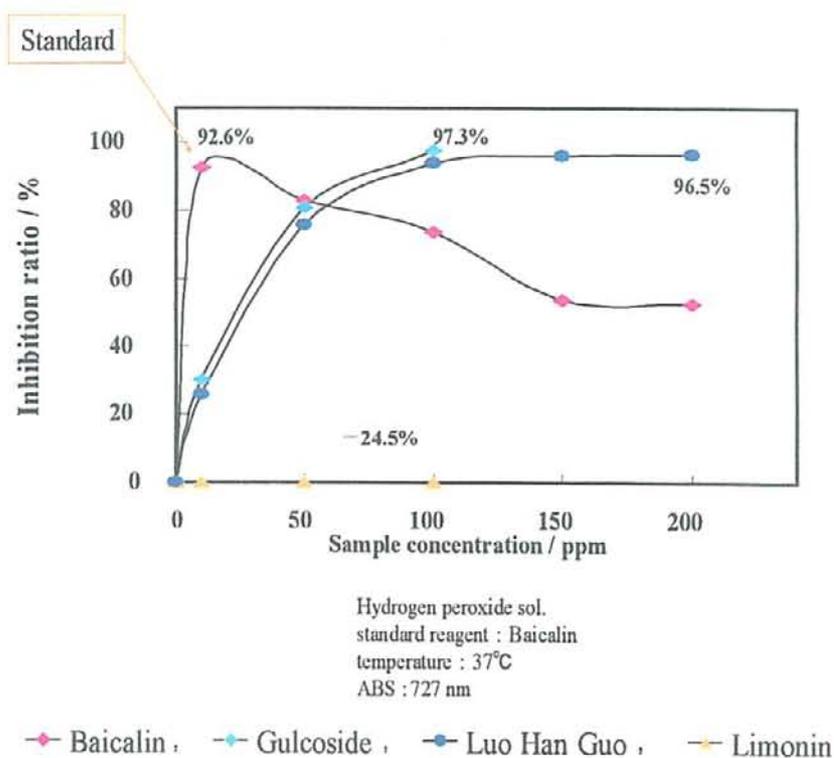


Fig.13 Hydrogen peroxide inhibitory effect

その結果、各サンプルでの抑制率最高値は、バイカリンは 92.6 % (10 ppm)、配糖体は 97.3 % (100 ppm)、羅漢果は 96.5 % (200 ppm)、リモニンは一24.5 % (200 ppm 以下) であった。カッコ内の数値は抑制率最高値が示されたときのサンプル濃度を示す。

4-4-3 DPPH に対するラジカル消去作用試験²⁹⁾

4-4-3-1 DPPH に対するラジカル消去作用試験の原理

ラジカルについて

フリーラジカル（遊離基）や活性酸素は核酸や脂質、タンパク質を攻撃して傷害を与える。生体膜を構成している多価不飽和脂肪酸は一重項酸素やヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）に攻撃されやすく連鎖的に脂質過酸化反応を起こし、脂質ラジカル、脂質ペルオキシラジカルを経て過酸化脂質を生成し蓄積する。この傷害が単なる膜構造の破壊にとどまらず、膜にある酵素や受容体などの機能にも障害が及び、細胞、臓器の機能に異常をきたし各種疾患の原因となる。ラジカルは不対電子（電子殻上で余っている電子）を持つ分子または原子で、一般的には不安定な物質である。不対電子を持つので他の物質を酸化させるなど反応性が高い。

DPPH について *Fig.14 に DPPH に対するラジカル消去反応を示す。

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) は皮膚などの窒素ラジカル的一种であり、ラジカルの中でもきわめて安定なラジカルで、黒紫色の結晶である。中央にある窒素が不安定な不対電子を持ち、これでラジカルとなる。これにラジカルスカベンジャーを作用させる、すなわち、連鎖的な酸化反応を停止させると不対電子が安定した電子対となり無色となる。

DPPH に対するラジカル消去作用試験について

メタノールに溶解した DPPH に試料溶液を反応させ、溶液の DPPH 量を吸光度 520 nm で測定し、試料のラジカル消去能を調べた。吸光度が低くなるほど、その消去能は高くなる。標準物質はアスコルビン酸を用いた。

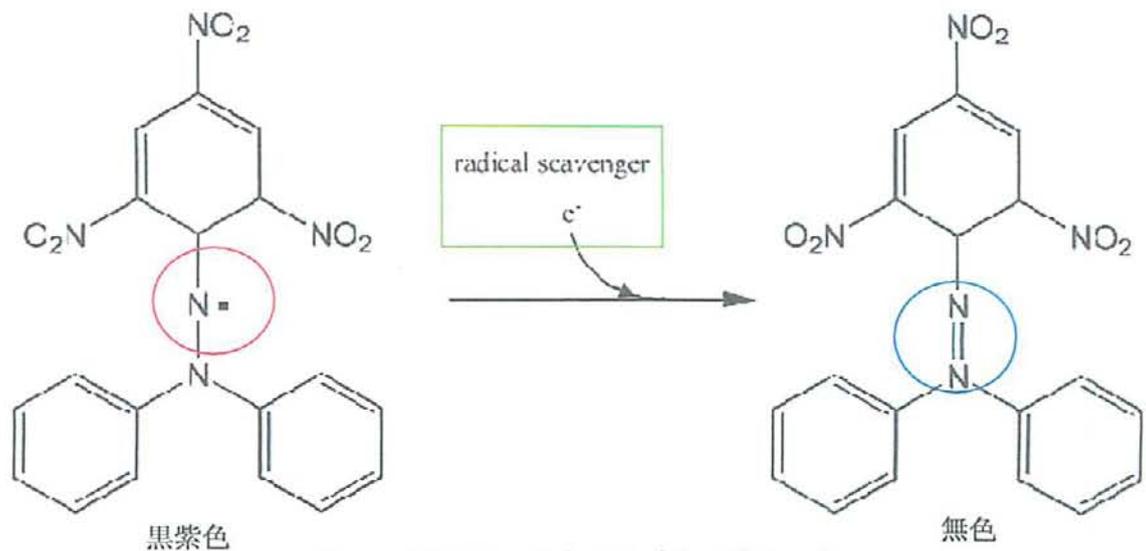


Fig.14 DPPH に対するラジカル消去反応

4-4-3-2 DPPH に対するラジカル消去作用試験結果

インキュベート温度は室温、吸光度測定波長は 520 nm、標準物質はアスコルビン酸を用いて行った。Fig.15 に DPPH に対するラジカル消去作用試験のグラフを示し、縦軸は抑制率、横軸はサンプル濃度を示す。

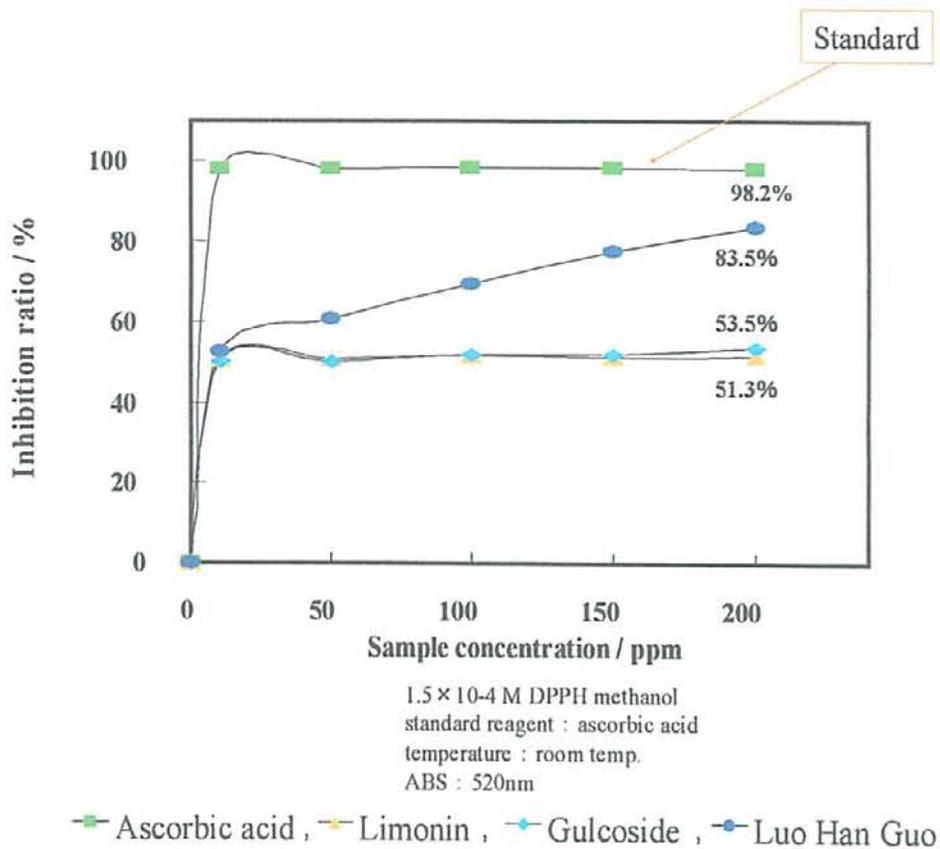


Fig.15 Radical erasure action for DPPH

その結果、各サンプルでの抑制率最高値は、アスコルビン酸は 98.2 % (100 ppm, 150 ppm)、羅漢果は 83.5 % (200 ppm)、配糖体は 53.5 % (200 ppm)、リモニン は 51.3 % (100 ppm, 200 ppm) であった。カッコ内の数値は抑制率最高値が示されたときのサンプル濃度を示す。

4-4-4 チロシナーゼ阻害活性測定³⁰⁾

4-4-4-1 チロシナーゼ阻害活性測定の実験原理

メラニンについて *Fig.16 に皮膚について示す

皮膚の色は主にメラニン色素によって決定される。また、メラニンは紫外線などでの一重項酸素などから生体を保護する役目も果たしている。しかし、過剰生産や不均一な蓄積は、皮膚の黒化やシミの原因となる。メラニンの生成と排泄のバランスが崩れ、表皮細胞内にメラニンが過剰に蓄積したものが色素沈着で、日常生活では日焼けやニキビ後に起こる色素沈着や、老化とともに現れる色素斑などがある。これらの原因は炎症、ホルモンバランス、遺伝的要因などさまざまだが、紫外線の影響により助長される。メラニンは表皮基底層にあるメラノサイト内の細胞小器官であるメラノソームで生成された後ケラチノサイトへ受け渡される。そして、ケラチノサイト内で分解を受けながら角化の流れに乗り最終的には角化細胞の落屑とともに皮膚から消失する。

チロシナーゼについて *Fig.17 にメラニン生成経路を示す。

メラニンの生成は、アミノ酸の一つであるチロシンを基質とする酸化酵素チロシナーゼの働きにより Pheo-Melanin 及び Eu-Melanin が合成される。メラニンの生成経路で、チロシナーゼが関わる場所は3つあり(①~③)、マッシュルーム由来チロシナーゼを使用する酵素活性阻害測定では、チロシンから DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) (①)、DOPA から DOPA-quinone へ代謝される経路(②)の2つに関わる。

チロシナーゼ阻害作用測定法について

今回の試験ではマッシュルーム由来のチロシナーゼを使用し、そのチロシナーゼ活性を試料により抑制できるかを検討した。そしてチロシナーゼ作用点の先で生成される DOPA-chrome 量を吸光度 475 nm で吸光度測定を行い、比色法により *in vitro* での活性評価を行った。吸光度が低くなるほど消去能は高くなる。標準物質はアスコルビン酸を用いた。

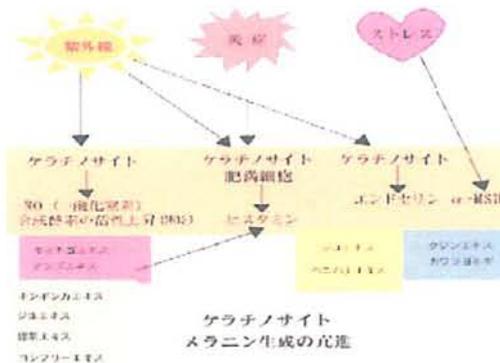


Fig.16 皮膚について

チロシナーゼ阻害剤

- グラブプリシン (甘草)
- ルシノール
- ソウハクセエキス
- クジン、ユキノシタエキス
- サイシン、オウゴンエキス等
- ゆず*

還元剤

- アスコルビン酸

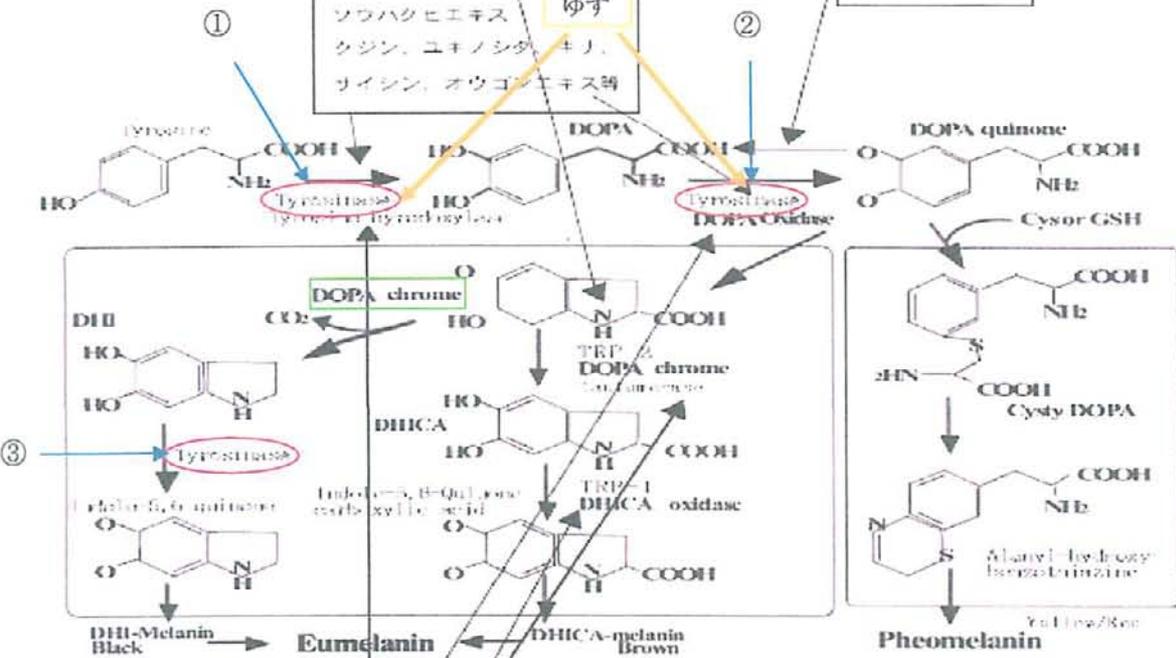


Fig.2 Biosynthesis of eumelanin and pheomelanin.

- コウジ酸
- エラグ酸

その他
 表皮細胞の代謝促進 (人参エキス、トウモロコシ、オト)
 剥離促進 (AHA含有植物エキス)
 (フルーン、リンゴ、サンザシ、タイソウ等)

Fig.17 メラニン生合成経路

4-4-4-1 チロシナーゼ阻害活性測定結果

インキュベート温度は 37 °C、吸光度測定波長は 475 nm、標準物質はアスコルビン酸を用いて行った。Fig.18 にチロシナーゼ阻害活性作用試験のグラフを示し、縦軸は抑制率、横軸はサンプル濃度を示す。

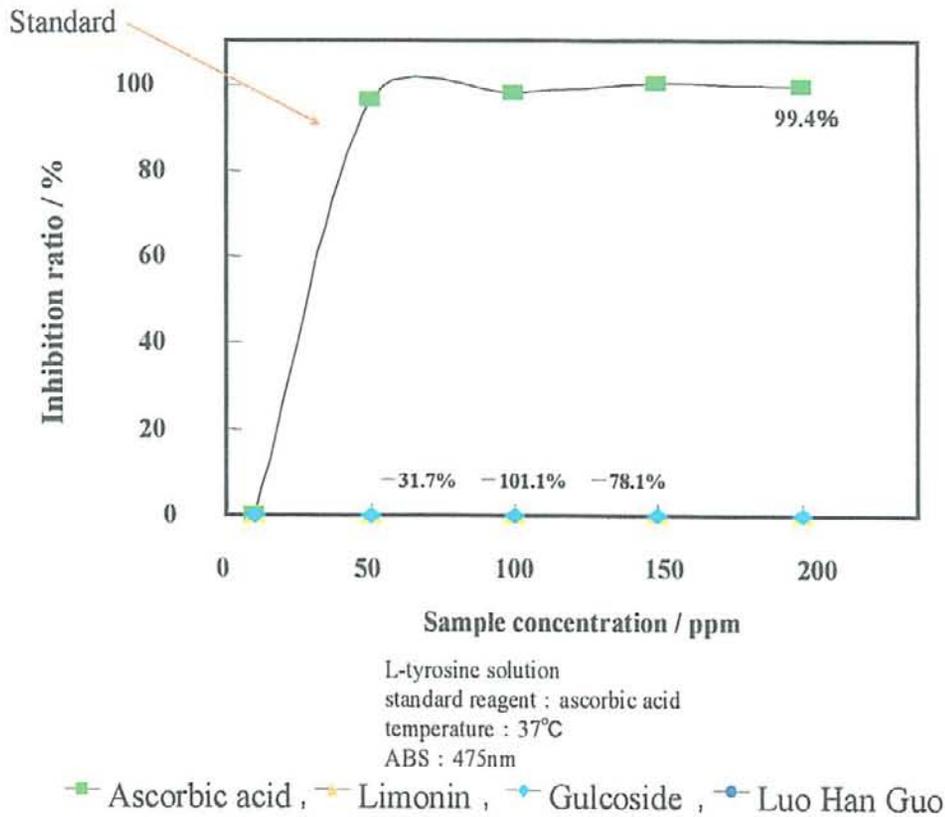


Fig.18 Tyrosinase inhibitory effect

その結果、各サンプルでの抑制率最高値は、アスコルビン酸は 99.4 % (200 ppm)、羅漢果は -31.7 % (200 ppm 以下)、配糖体は -101.1 % (200 ppm 以下)、リモニンは -78.1 % (200 ppm 以下) であった。カッコ内の数値は抑制率最高値が示されたときのサンプル濃度を示す。

5. 考察

配糖体分離抽出方法について

今回のこの手順ではまず、種を細かく砕き、これをヘキサンで抽出することによってオレイン酸などが含まれるオイル分や脂溶性アグリコンが取り除かれる。次にこの残渣をアセトンで抽出し、ヘキサンで取り除けなかった細胞中に存在していた脂溶性アグリコンや水溶性の性質も持つ D 環が開環している構造のアグリコンが抽出される。そして極性を持つメタノールで水溶性成分である配糖体（グルコサイド）を抽出する。そして最後にアセトン層とメタノール層をそれぞれ乾固させ、極性を持たないジクロロメタンと水（1:1）で最終的に脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体に分けた。このようにリモノイドにはそれぞれ性質の違う 3 つの構造が認められており、A 環及び D 環が開環している構造と、A 環が開環し D 環が開環している脂溶性のアグリコン、さらに開環した D 環に糖が結合した水溶性の配糖体がある（Fig.19 参照）。近年、脂溶性アグリコンのリモニンには口腔内腫瘍に対し増殖抑制作用が、ノミリンには腫瘍形成抑制作用が報告され始めている。このような作用はアグリコンの A 環と D 環に起因していると言われているが、A 環も D 環もないノミリン酸配糖体にもわずかではあるが活性作用が認められていることから、その他の配糖体にも活性があるのではないかと考えた。

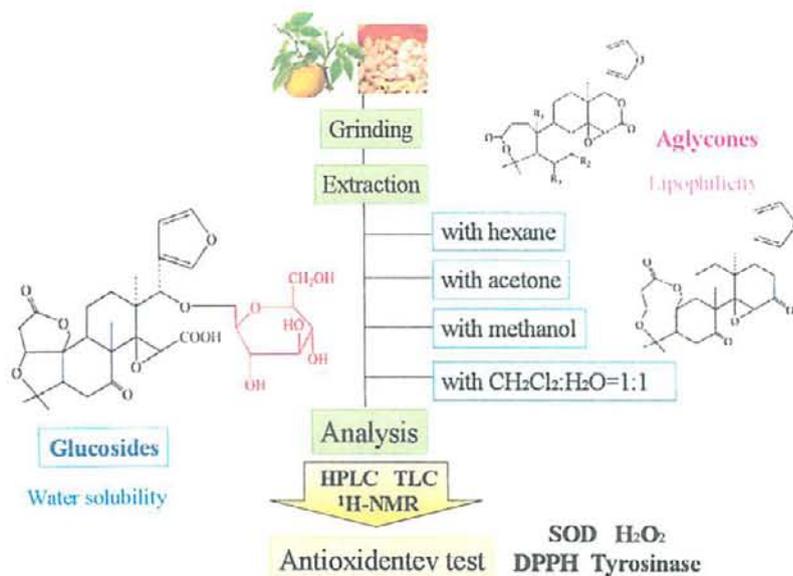


Fig.19 Separation Analysis of yuzu seed

今回分離した配糖体は HPLC や TLC で定性し、さらに ¹H-NMR で配糖体であることを確認した。HPLC では逆相で単品のリモニンの保持時間が 8 分、ノミリンが約 13 分で、分離した配糖体は 4 分前後であることから水性成分であることが確認できた。TLC では脂溶性成分を分離する展開溶媒では全く展開できず、水溶性成分を分離する展開溶媒で展開で

きていたことから水溶性成分であることを確認した。また、 $^1\text{H-NMR}$ で糖の特徴的ピークが見られたことからこれらを配糖体として使用した。しかし、この中には最低でも 4 種類くらいの成分が入っていることが HPLC の結果から分かったので、今後はこれらを単品にしていく方法を検討しなければならない。

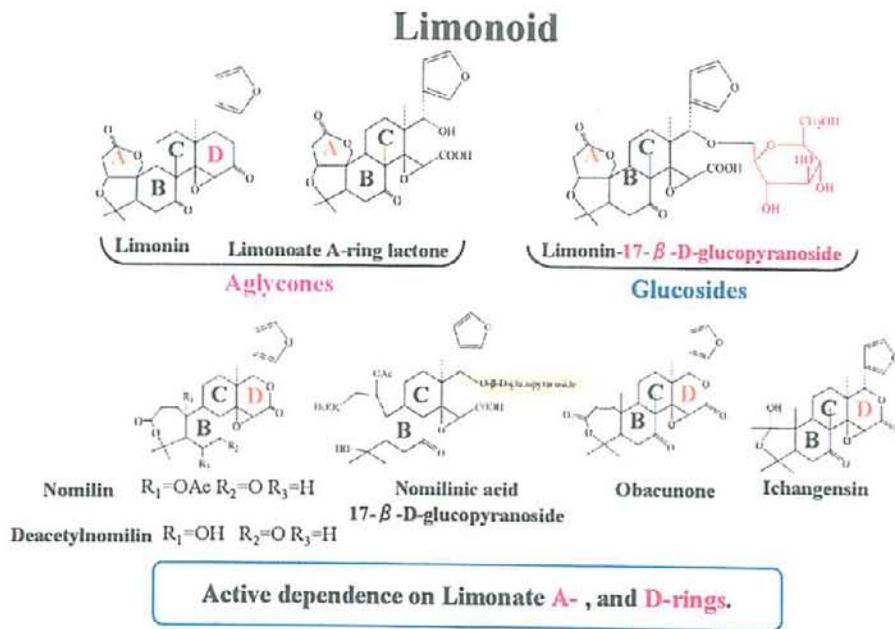


Fig.20 limonoids in *Citrus*

生理活性について

SOD 様活性作用試験では、上述したように体内に発生したスーパーオキシド (O_2^-) を過酸化水素と酸素に変える体内酵素の SOD のような働きが配糖体にもあるかをみた。標準物質にバイカリン、比較として市販のリモニン、焙煎羅漢果抽出液中の配糖体を用いた。バイカリンは漢方として用いられているオウゴンに含まれる成分で、リモニンは近年口腔内腫瘍に対し、増殖抑制作用が報告されており、リモノイドアグリコンの中でも注目されている成分である。また、羅漢果は中国では古くから咳止め、気管支炎、便秘などに効果があるとして民間薬として用いられてきたが、最近ではその抗酸化作用も注目されている。羅漢果は中国の中でも極限られた地域でしか栽培されておらず、貴重でとても高価なものである。しかし SOD 様活性作用試験で私たちの分離した配糖体は、この羅漢果にも匹敵する高い活性があり、さらにリモニンよりも高いことが分かった。

過酸化水素消去作用試験では SOD の働きによって発生した過酸化水素を水と酸素に分解するカタラーゼと同じ働きをするかをみている。この試験でも標準物質にバイカリン、比較として市販のリモニンと配糖体を用いた。その結果リモニンには全く抑制作用が見られなかったが、羅漢果と配糖体は 100% に近いとても高い抑制率を示した。今回は試料や時間の関係上リモニンと配糖体は 100 ppm までしか結果が出せなかったため、今後は 150

ppm と 200 ppm の結果を出さなくてはならない。しかし配糖体は 100 ppm ですでに羅漢果の抑制率を超えているので、配糖体には過酸化水素消去に関してものすごく高い活性があることが分かった。

DPPH に対するラジカル消去作用試験では、酸素以外のフリーラジカルに関しても抑制作用があるかをみている。この試験では標準物質には一般的にも抗酸化作用が知られているアスコルビン酸（ビタミンC）を用い、比較として市販のリモンと羅漢果を用いた。その結果、アスコルビン酸はほぼ 100% の抑制率を示し、配糖体は羅漢果には届かなかったもののリモンをわずかに上回る活性を有することが分かった。これらのことから呼吸に関するラジカル以外にも効果があることが分かった。

チロシナーゼ阻害活性作用試験では、チロシンを基質としてメラニン合成するチロシナーゼの働きを抑制できるかをみた。この試験では標準物質にアスコルビン酸、比較として市販のリモンと羅漢果を用いた。その結果、美白効果があるアスコルビン酸にはほぼ 100% の阻害率がみられたが、リモン、羅漢果、配糖体はいずれも全く阻害していないことが分かった。このことから、美白効果は期待できないことが分かった。

Table 3 Bioactivity evaluation

Examination item	Standard	inhibition ratio (%)		Luo Han Guo
		yuzu seed		
		Limonin	Gulcoside	
Evaluation of SOD activity	100.0	24.7	31.4	38.2
Hydrogen peroxide inhibitory effect	92.6	-24.5	97.3	96.5
Radical erasure action for DPPH	98.2	51.3	53.5	83.5
Tyrosinase inhibitory effect	99.4	-78.1	-101.1	-31.7

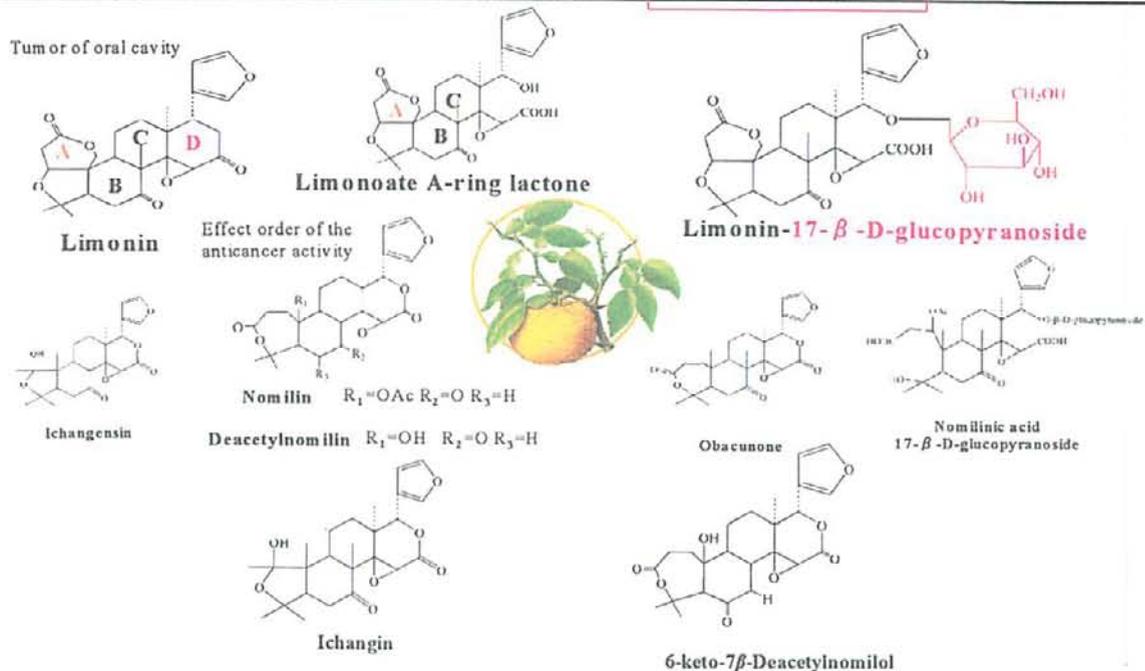


Fig.21 limonoids in *Citrus*

いずれの試験でも配糖体として使ったものは少なくとも 4 成分は入っていると思われるので、これら全てが混ざっていることにより高い活性が得られているのか、またはそのうちのどれかに高い活性があり、このような結果が得られたのかを見るためにも、今後はその中の成分を単離し、比較検討する必要があると思う。また、これらの結果から、配糖体は脂溶性リモニンを超える活性能を有し、その結果は高い抗酸化作用があるといわれている羅漢果にも匹敵するものであった。また、これらはチロシナーゼ活性は全く示さなかったことから、美白に関する効果は期待できないが、酸素呼吸に関し、高い抗酸化能を有していることが分かった。これらのことからユズ種子中のリモノイド類は脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体のそれぞれの特性を生かし、食品や医薬品など幅広い方面に新規の機能性材料としての応用が大いに期待できるだろう。

6. 個人考察

個人考察 034-0044 亀田 ゆき絵

私たちはグリーンケミストリーとゼロ・エミッションの観点から、今までの石油バイオマスに変わる環境にやさしい植物系のバイオマスを用いた研究を行った。昨年までにジュース搾汁後のレモンやユズ残渣の食物繊維を用いた重金属吸着剤の合成に世界で初めて成功した。本年度は繊維だけでなく、未利用部位の種を活用するという、トータルシステムの構築を目的とした。

今回はカンキツ類の種子中に多く含まれているリモノイドという成分に着目し、論文を参考にしてヘキサン、アセトン、メタノール、ジクロロメタン：水 = 1：1の順で抽出・分離を行った。ジクロロメタン：水 = 1：1で抽出する時に3層に分かれてしまったのは、乾固していなかったことや、抽出溶媒を変えるときに前の溶媒が取り除ききれいでなかったためと思われるので、抽出の際は、分液操作をしっかりと行い、次の溶媒の1回目か2回目までは別にしておいた方がいいと思った。

抽出・分離したものをTLCとHPLCと¹H-NMRを用いて分析し、各抽出層に何成分含まれているか確認した。TLCでは脂溶性リモノイドの展開溶媒を3種類、水溶性リモノイドの展開溶媒を1種類用意した。脂溶性リモノイドの展開溶媒(1)は分離能が一番よく、参考にした文献とのRf値も近かった。展開溶媒(2)と(3)はテーリングしたり、分離しなかった。テーリングは、スポット後しっかりと乾燥させなかったことや、展開溶媒に沸点が低いジクロロメタンを用いたことが原因で起こったと考えられる。HPLCでは試料溶媒にアセトンを用いたことで再現性がとれなかったり、逆相カラムを用いたことにより脂溶性リモノイドがなかなか溶出されずカラムが詰まることがあったので、今後は移動相の検討やカラムの検討をし、より単品に近いものを確認したいと考えた。また大学に依頼をした¹H-NMRの結果は、特徴的な糖の構造を確認できたので、配糖体を得ることが出来たと考えられる。

分析機器で脂溶性・水溶性(配糖体)を確認し、それぞれの物質で酸素呼吸系と、皮膚に関する活性試験を行い評価した。酸素呼吸に関するSOD様作用活性試験と過酸化水素消去作用試験で配糖体は、抗酸化力に優れているといわれる羅漢果に匹敵する活性を得られたので、単離・精製すれば活性は高くなると考えられる。しかし、皮膚に関するチロシナーゼ阻害活性作用試験ではよい結果が得られなかったので、チロシナーゼ阻害活性はないと考えられる。

これらから、今後は単離・精製をして活性を調べ、食品や医薬品、サプリメントなどの添加物としての活用を期待しています。

最後になりましたが、本研究を行うにあたり多大なるご指導、ご鞭撻をいただきました機器分析専攻コースの南澤 磨優寛先生、高井 信治先生、吉田 章一郎先生、今井 亜希子

先生、また 3 年間通してサポートして下さった諸先生方に厚く御礼申し上げます。ありがとうございました。

個人考察 034-0078 大司 由紀恵

私達はグリーンケミストリーとゼロ-エミッションの観点から植物バイオマスの一つであるユズを余すことなく活用するための方法やシステム構築を検討した。現在石油製品は私達の生活に必要な不可欠であるが、化石資源には限りがあり代替材料の研究が盛んに行われている。昨年までに私達のコースでは、植物バイオマスを用いたジュース搾り後のレモンやユズ残渣の食物繊維をマトリックスとした低コストで環境に優しい重金属吸着剤の合成に成功し、さらに種から抽出したシードオイルの抗酸化能の存在も示唆した。本年度は、シードオイル搾り後の残渣にも注目し、より詳細な検討を行った。ユズにはビタミン類やミネラル類、そしてリモノイド類などが多く含まれる活性成分として近年注目されている。リモノイドには脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体があり、種子中にも多く存在している。特に、リモノイド中の脂溶性のリモニンやノミリンなどのアグリコンには、抗酸化作用や抗がん作用が報告されている。しかし水溶性の配糖体についての研究報告は多くされておらず、私達はアグリコンと同じような活性があるのではないかと考え、この脂溶性成分と水溶性成分を抽出分離し、さらに *in vitro* での活性試験を行った。

配糖体の分離方法はまず種を細かく砕き、これをヘキサンに 2 週間ほど浸け、オレイン酸などのオイル分を主に分離した。この際にわずかではあるが、脂溶性のアグリコンも混入する。ヘキサンをエバポレートするとオイル分が残存し、市販のシードオイルと同様な形状になる。次にこの残渣をアセトンで抽出し、ヘキサンで取り除けなかった細胞中に存在していた脂溶性アグリコンや水溶性の性質も持つ D 環が開環している構造のアグリコンを抽出した。引き続き弱い極性を持つメタノールで水溶性成分である配糖体（グルコサイド）と親水性のアグリコンを抽出する。最後にアセトン層とメタノール層をそれぞれ乾固させ、無極性のジクロロメタンと水を 1:1 の組成で最終的に脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体に分離させた（Fig.19 参照）。このようにリモノイドには性質の異なる 3 つの構造が主に考えられる。すなわち A 環及び D 環が開環している構造と、A 環が開環し D 環が開環している脂溶性のアグリコン、さらに開環した D 環に糖が結合した水溶性の配糖体がある（Fig.22 参照）。

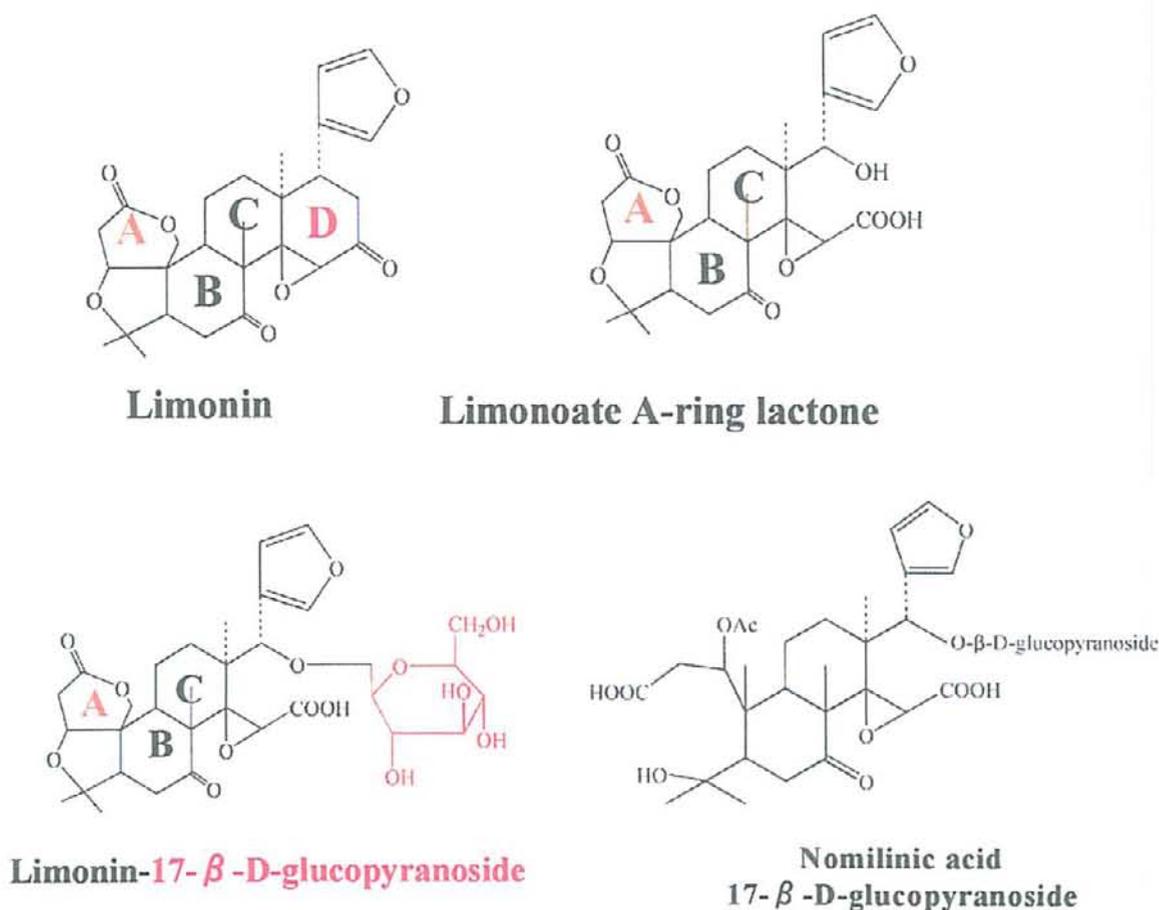


Fig. 22 The structure of Limonin

上述したリモニンやノミリンの抗酸化や抗がん作用はA環とD環の構造に起因していると言われているが、A環もD環もないノミリン酸配糖体（Fig.22 参照）にもわずかではあるが活性作用が認められていることから、その他の配糖体にも活性があるのではないかと考えた。

今回分離した配糖体はHPLCやTLCで分離定性し、¹H-NMRでも配糖体の存在を確認出来た。しかし、この成分中には最低でも4種類以上の組成が混在していることがHPLCの結果から分かっているので、今後はこれらを純粋な化合物に単離していく方法を検討しなければならない。そのためにもHPLCのリン酸緩衝液を用いた移動相の検討やカラムをODS-2カラムだけではなく、我々のコースのホームメイドカラムのゾルゲルカラムの活用による分離能の向上、及び分取することも検討すべきだろう。また、今回は定量していないため、今後は定量して種からの回収率を求める必要がある。さらに乾燥種と生種でアグリコンと配糖体のそれぞれの回収率を求め存在比の比較もしたほうがいいだろうと思う。

生理活性作用試験に関しては、SOD様活性作用試験、過酸化水素消去作用試験、DPPHに対するラジカル消去作用試験、チロシナーゼ阻害活性作用試験の4項目を行った。抗酸化作用の項目でも書いてあるように人間は呼吸によって吸気した酸素の3~15%が非常に強力な酸化力を持つ活性酸素になり、この活性酸素は感染症の予防治療（マクロファージ

や白血球が持つ殺菌作用)の機能を持つ防衛酸素と細胞膜や遺伝子を傷つける有害酸素に転化する。体内にはこの有害酸素を体内酵素のSODやカタラーゼ等で無毒化するシステムが存在し、健康な状態では代謝平衡を保っているが、ストレスや紫外線、タバコなどの有毒物の摂取によりこの代謝平衡が崩れると身体に悪影響が及ぼされる可能性が高くなり、近年ではビタミン類やポリフェノールなどの抗酸化物の導入が注目されている(Fig.6参照)。

そこで私たちの分離した配糖体にもこのような抗酸化作用があるか4項目の試験で検討した。まず、SOD様活性作用試験では体内に発生したスーパーオキシド(O_2^-)を過酸化水素と酸素に変える体内酵素のSODの様な働きが配糖体にもあるかをみた。標準物質にバイカリン、比較として市販のリモニン、焙煎羅漢果抽出液中の配糖体を用いた。バイカリンは漢方として用いられているオウゴンに含まれる成分で、リモニンは近年口腔内腫瘍に対し、増殖抑制作用が報告されており、リモノイドアグリコンの中でも注目されている成分である。また、羅漢果は中国では古くから咳止め、気管支炎、便秘などに効果があるとして民間薬として用いられてきたが、最近ではその抗酸化作用が化学的に検討され始めた。羅漢果は中国の中でも極限られた地域でしか栽培されておらず、貴重でとても高価なものである。しかしSOD様活性作用試験で私たちの分離した配糖体は、この羅漢果にも匹敵する高い活性があり、さらにリモニンよりも高いことが分かった。

過酸化水素消去作用試験ではSODの働きによって発生した過酸化水素を水と酸素に分解するカタラーゼと同じ働きをするかを検討している。この試験でも標準物質にバイカリン、比較として市販のリモニンと羅漢果を用いた。その結果リモニンには全く抑制作用が見られなかったが、羅漢果と配糖体は100%に近いとても高い抑制率を示した。今回は試料や時間の関係上リモニンと配糖体は100ppmまでしか結果が出せなかったもので、今後は150ppmと200ppmの結果を出さなくてはいけない。しかし、配糖体は、100ppmですでに羅漢果の抑制率を超えているので、配糖体には過酸化水素消去に関してものすごく高い活性があることが分かった。

DPPHに対するラジカル消去作用試験では、酸素以外のフリーラジカルに関しても抑制作用があるかをみている。この試験では標準物質には一般的にも抗酸化作用が知られているアスコルビン酸(ビタミンC)を用い、比較として市販のリモニンと羅漢果を用いた。その結果、アスコルビン酸はほぼ100%の抑制率を示し、配糖体は、羅漢果には届かなかったものの、リモニンをわずかに上回る活性を有することが分かった。これらのことから呼吸に関するラジカル以外にも効果があることが分かった。

チロシナーゼ阻害活性作用試験では、チロシンを基質としてメラニンを合成するチロシナーゼの働きを抑制できるかをみた。この試験では標準物質にアスコルビン酸、比較としてリモニン単品と羅漢果を用いた。その結果、美白効果があるアスコルビン酸にはほぼ100%の阻害率がみられたが、リモニン、羅漢果、配糖体はいずれも全く阻害していないことが分かった。このことから、美白効果は期待できないことが分かった(Fig.18参照)。

これらの結果から、配糖体は脂溶性リモニンを超える幅広い活性能を有し、その結果は羅漢果にも匹敵するものであることが分かった。また、これらはチロシナーゼ活性は全く示さなかったことから、美白に関する直接的な効果は期待できないが、酸素呼吸に関し、高い抗酸化能を有していることが分かった。これらのことからユズ種子中のリモノイド類は脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体のそれぞれの特性を生かし、食品や医薬品など幅広い方面に新規の機能性材料としての応用が大いに期待できるだろう。

今後の展望としては、いずれの試験でも配糖体として使ったものは少なくとも4成分は入っていると思われるので、これら全てが混ざっていることにより高い活性が得られているのか、またはそのうちのどれかに高い活性があり、このような結果が得られたのかを見るためにも、今後はその中の成分を単離し、比較検討する必要があると思う。また、活性試験は4項目しか行えなかったもので、今後は試験項目を増やし、さらに細かく検討していく必要がある。さらに、試験はいずれも *in vitro* なので、マウスなどの実験動物を使った *in vivo* でも平行して検討したい。

最後になりましたが、本研究を行うにあたり多大なるご指導ご鞭撻をいただきました南澤磨優寛先生、吉田章一郎先生、高井信治先生、今井亜希子生、そして協力してくださった講師の先生方に厚く御礼申し上げます。先生方のおかげで学習成果発表会などとても貴重な経験をすることができました。本当にありがとうございました。

個人考察 034-0092 豊間根 純一

背景

現在、私たちの生活は石油製品を使った生活に支えられているが、この化石資源の埋蔵量には限りがあり、代替材料の研究が盛んに行われている。そこで私たちは、グリーンケミストリーとゼロ-エミッションの観点から、植物バイオマスの一つであるユズに着目し、皮や種も余すことなく活用するためのトータルシステム構築を検討した。

ユズは古来からアジア圏で漢方、薬味、柚子湯などとして愛用され、親しまれている柑橘類の一つである²⁾。そして昨年、種から抽出したオイルの抗酸化作用を示唆した⁴⁾。

本年度はシードオイル搾汁後の残渣に注目した。カンキツ系の果汁やオイル、残渣にはリモノイドが含まれており、リモノイド中には脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体が存在している。特に脂溶性成分中のリモニンやノミリンなどのアグリコンには抗酸化作用や抗がん作用があることが報告されているが^{5,6,7)} 水溶性の配糖体に関する研究報告はまだ多くなく、我々はアグリコンと同様な活性がないかと考え、これらを抽出分離し、*in vitro*での各種生理活性試験を行った。

配糖体分離抽出方法について

まず、種を粉砕し、ヘキサン抽出することでオイル分や脂溶性アグリコンが取り除かれる。次にこの残渣をアセトン抽出し、ヘキサンで取り除けなかった細胞中に存在していた脂溶性アグリコンや水溶性の性質も持つ D 環が開環している構造のアグリコンが抽出される。そして極性を持つメタノールで水溶性成分である配糖体（グルコサイド）を抽出する。さらに最後にアセトン層とメタノール層をそれぞれ乾固させ、極性を持たないジクロロメタンと水（1：1）で最終的に脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体に分離した。このようにリモノイドにはそれぞれ性質の違う 3 つの構造が認められており、A 環及び D 環が開環している構造、A 環が開環し D 環が開環している脂溶性のアグリコン、さらに開環した D 環に糖が結合した水溶性の配糖体がある。近年、脂溶性アグリコンのリモニンには口腔内腫瘍に対し増殖抑制作用が、ノミリンには腫瘍形成抑制作用が報告され始めている。このような作用はアグリコンの A 環と D 環に起因していると言われているが、A 環も D 環もないノミリン酸配糖体にもわずかではあるが活性作用が認められていることから、その他の配糖体にも活性があるのではないかと考えた。

今回分離した水溶性成分は HPLC や TLC で定性し、HPLC では逆相カラムで単品のリモニンの保持時間が約 8 分、ノミリンが約 13 分で、抽出した配糖体は 4 分前後であることから水性成分であることが再確認できた。TLC では脂溶性成分を分離する展開溶媒では全く展開できず、水溶性成分を分離する展開溶媒で展開できていたことから水溶性成分であることが再確認された。また、¹H-NMR で糖の特徴的なピークが確認できたことからこれらを配糖体と決定し使用した。しかし、HPLC の結果からこの中には最低でも 4 種類以上の成分が入っていることが明らかになったので、今後はこれらを精製し単品にしていく方法を検討しなければならない。

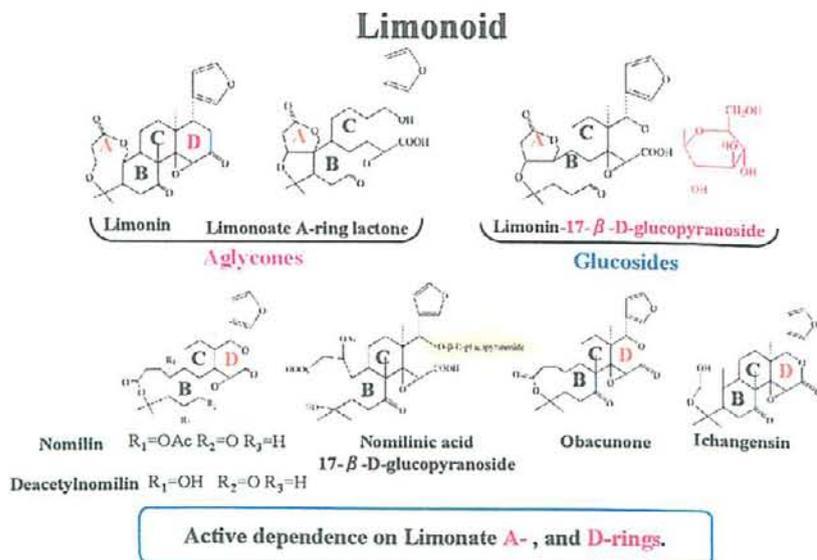


Fig.20 limonoids in *Citrus*

生理活性作用試験について

SOD 様活性作用試験では、体内に発生したスーパーオキシド (O_2^-) を過酸化水素と酸素に分解する体内酵素の SOD のような働きが配糖体にもあるかを確認する。標準物質にバイカリン、比較として市販リモニン、羅漢果を用いた。リモニンは近年、口腔内腫瘍に対し、増殖抑制作用が報告されており、リモノイドアグリコンの中でも注目されている成分である。この試験で配糖体には、抗酸化作用で知られている羅漢果に匹敵する高い活性があり、さらにリモニンよりも約 1.3 倍の高い活性が確認された。

過酸化水素消去作用試験では配糖体が SOD の働きによって発生した過酸化水素を水と酸素に分解するカタラーゼと同じ働きをするかを確認する。この試験でも標準物質にバイカリン、比較として市販リモニンと羅漢果を用いた。その結果リモニンには全く抑制作用が見られなかったが、羅漢果と配糖体は 100 % に近いとても高い抑制率を示した。今回は試料や時間の関係上リモニンと配糖体はサンプル濃度が 100 ppm までの結果しか出せなかったため、今後は 150 ppm と 200 ppm の結果を出さなくてはならない。しかし配糖体は 100 ppm の時点ですでに羅漢果の抑制率を超えているので、配糖体には過酸化水素消去作用に関してものすごく高い活性があることが確認された。

DPPH に対するラジカル消去作用試験では、配糖体に酸素以外のフリーラジカルに関して抑制作用があるかを確認する。この試験では標準物質には一般的にも抗酸化作用が知られているアスコルビン酸 (ビタミン C) を用い、比較として市販リモニンと羅漢果を用いた。その結果、アスコルビン酸はほぼ 100 % の抑制率を示し、配糖体は羅漢果には届かなかったもののリモニンを上回る活性を有することが確認された。これらのことから酸素呼吸に関するラジカル以外にも効果があると考えられる。

チロシナーゼ阻害活性作用試験では、配糖体がチロシンを基質としてメラニンを合成するチロシナーゼの働きを抑制できるかを確認した。この試験では標準物質にアスコルビン酸、比較として市販リモニンと羅漢果を用いた。その結果、美白効果が確認されているアスコルビン酸はほぼ 100 % の阻害率がみられたのに対し、リモニン、羅漢果、配糖体はいずれも全く阻害していないことが確認された。このことから、直接的な美白効果は期待できないと考えられる。

Table 3 Bioactivity evaluation

Examination item	Standard	inhibition ratio (%)		
		yuzu seed		Luo Han Guo
		Limonin	Gulcoside	
Evaluation of SOD activity	100.0	24.7	31.4	38.2
Hydrogen peroxide inhibitory effect	92.6	-24.5	97.3	96.5
Radical erasure action for DPPH	98.2	51.3	53.5	83.5
Tyrosinase inhibitory effect	99.4	-78.1	-101.1	-31.7

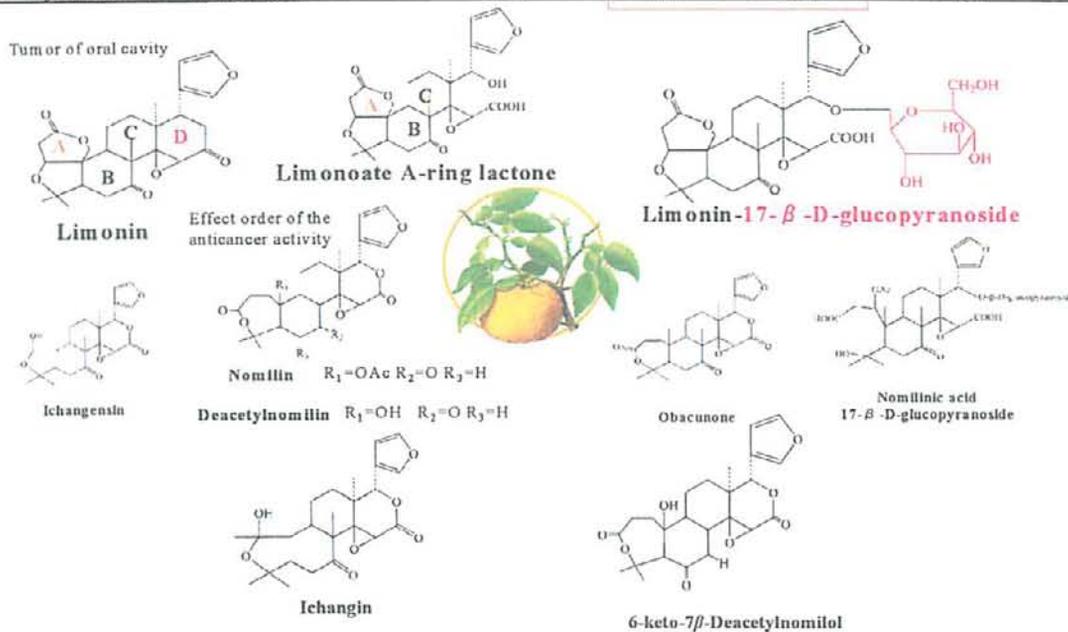


Fig.21 limonoids in *Citrus*

いずれの試験でも配糖体として使用したものは少なくとも4成分は入っていると思われるので、これら全てが影響することにより高い活性が得られているのか、またはそのうちのどれかに高い活性があり、このような結果が得られたのかを明らかにするためにも、今後はその中の成分を単離、精製し、比較検討する必要があると考える。また、これらの結果から、配糖体は脂溶性リモンンを超える活性能を有し、その結果は高い抗酸化作用があるといわれている羅漢果に匹敵するものであった。また、これらはチロシナーゼ阻害活性については全く示さなかったことから、美白に関する効果は期待できないと思われるが、酸素呼吸に関する活性酸素や、フリーラジカルに対しては高い抗酸化能を有していることが確認できたので、抗酸化物質として利用できるようさらなる研究が必要である。以上のことから植物バイオマスの一つであるユズ種子中のリモノイド類は、脂溶性のアグリコンはクリームなどとして、水溶性の配糖体はドリンク剤などとして、それぞれの特性を生かした、食品や医薬品など幅広い方面に新規の機能性材料としての応用が大いに期待できると結論づけられた。

分離抽出

今回の分離抽出法で、水性リモノイドである配糖体が抽出できた。抽出方法は水溶性成分の分離を目的として、乾いた種を細かく砕き、それをヘキサン、アセトン、メタノールの順に抽出を行い、順次脂溶性リモノイドを分離してからジクロロメタンと水（1:1）で水層部分に水溶性リモノイドを抽出する手法をとった。ここでヘキサン抽出した層は分離されたものは市販のシードオイルと同様な抽出方法であり、主に極性の少ない脂溶性の活性成分が種から抽出できていると思われる。このシードオイル中に溶解している成分の何が強く活性に作用しているのか、今後検討していきたい。

次にアセトンでユズ種子繊維中から残存活性成分を遊離させ、無極性のアグリコンを抽出し、アセトンより極性の低いメタノールで、ユズ種子繊維から残りのアグリコンと全ての配糖体を分離した。アセトン・メタノール抽出においては分液ロートで複数回抽出を行うが、抽出1回目の抽出液と2回目以降の抽出液を分けて成分分析を検討したい。ジクロロメタンと水（1:1）での分離では、ユズ種子中に含まれる水とジクロロメタンの中間に薄い層ができたので、それを別サンプルとして成分分析を行い、各活性評価を行いたい。

配糖体は熱を加えたり酸性に傾けたりすると変性してしまうので、保存やエバポレートさせる際には十分に取り扱いに注意し、凍結乾燥器で乾固させたものにおいては湿気に注意する。特に、それらを冷凍保存したときのものを出すと容器が結露するので注意する。

今回抽出したものは大きく分けて、ヘキサン抽出物、アセトン抽出物、メタノール抽出物、塩化メチレン抽出物、水抽出物の5つであり、それらの定量はまだ行っていないため、論文の記述を比較し、定量し、回収率を高め、脂溶性成分と水溶性成分の単離方法の検討を行いたい。

抽出物の分析

薄層クロマトグラフィー（TLC）で標準品として市販のリモニン、ノミリン、ナリンギン、ヘスペリジンが確保できた。これらを用いて、脂溶性成分の展開溶媒を文献より3種選択し、水溶性成分の展開溶媒を酢酸エチルと2-ブタノン、88% 蟻酸、水（5:3:3:1）で展開した。

TLCでは、脂溶性成分の展開がシクロヘキサンと酢酸エチル、酢酸エチルとジクロロメタンでの分離が比較的よかったので、これら二つに共通する酢酸エチルが脂溶性成分と相性のよい溶媒なのではないかと推測できる。今後はそれを踏まえて脂溶性成分のTLCでの展開溶媒の検討を行いたい。

水溶性成分である配糖体のテーリングが目立ち複数回操作を行ったがどれもテーリングしてまった。このことから水溶性成分の配糖体のテーリングを防ぐために展開溶媒の検討を

行い、二次展開を行いたいと思う。

また、サンプルの発色方法においてヘスペリジンやナリンギンがエーリッヒ試薬では発色しなかったので、蛍光入り薄層板や二次展開の展開溶媒についても検討してみる必要があると思う。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）については、逆相クロマトカラムで標準品のリモニンとノミリンの保持時間が8分と13～14分だった。さらに、抽出して得られた水溶性成分は4分前後の保持時間だったことから脂溶性であるリモニンやノミリンより水溶性しやすいものであることが確認できた。今回、分析に用いた移動相はメタノールと水の比率を変えたものだったので比率の検討をする。更に3mMリン酸に15%アセトニトリルがはいった移動相で始め、移動相の濃度を時間ごとに変えていくグラジエントを使った分析も検討していきたい。さらに今回ODS-2カラムで分離を行ったが、それ以外のカラムの検討として、ゾルゲルカラムを用いた分離や、カラムの本数を変えて分離能をあげて未知成分の単離および回収ができることを期待する。

ユズ抽出物の活性評価

SOD用活性作用試験では、体内で発生したスーパーオキシドをスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）という体内酵素の力で過酸化水素に変える働きが、私たちが抽出した配糖体にもSODと同様の作用があるか調べるために試験を行った。

過酸化水素消去試験では、SODの働きによって発生した過酸化水素をカタラーゼ（今回の実験ではペルオキシダーゼを用いた）が水と酸素に変える働きが、私たちの抽出した配糖体にもカタラーゼと同様の作用があるか調べるために試験を行った。

これらの試験では標準物質にバイカリンを用い、試料は市販リモニン、羅漢果配糖体、ユズ種子から抽出した配糖体で各活性評価を行った。その結果SOD様活性試験では配糖体はリモニン以上の活性能を有し、羅漢果に匹敵するものだった。過酸化水素消去試験ではリモニンには全く抑制作用が見られず、羅漢果と配糖体は、ほぼ100%抑制率を示し、配糖体は羅漢果に匹敵する活性能があることがわかった。

DPPHに対するラジカル消去作用試験では、体内の呼吸以外で発生するフリーラジカルの消去作用をみた。この試験では標準物質に抗酸化作用が知られているアスコルビン酸（ビタミンC）を用い、試料は市販リモニン、羅漢果配糖体、ユズ種子から抽出した配糖体で活性評価を行った。結果、アスコルビン酸はほぼ100%の抑制率を示し、更に配糖体は羅漢果配糖体には届かないの、リモニンを上回る活性を有することが分かった。これらのことからラジカルに対しての消去効果があることが分かった。

チロシナーゼ阻害活性作用試験では、チロシンを基質としてメラニン合成するチロシナーゼの抑制能をみた。この試験では標準物質にアスコルビン酸、試料は市販リモニン、羅漢果配糖体、ユズ種子から抽出した配糖体で活性評価を行った。結果、美白効果が知られているアスコルビン酸にはほぼ100%の阻害率が認められたのに対し、リモニン、羅漢果配糖体、ユズ種子から抽出した配糖体はいずれも全く阻害していない。これより、リモニンやユズ種子から抽出した配糖体、羅漢果配糖体は直接メラニン合成を阻害出来ない事が解った。

Table 3 Bioactivity evaluation

Examination item	Standard	inhibition ratio (%) yuzu seed		Luo Han Guo
		Limonin	Gulcoside	
Evaluation of SOD activity	100.0	24.7	31.4	38.2
Hydrogen peroxide inhibitory effect	92.6	-24.5	97.3	96.5
Radical erasure action for DPPH	98.2	51.3	53.5	83.5
Tyrosinase inhibitory effect	99.4	-78.1	101.1	-31.7

今回の実験より、私たちが抽出した配糖体には複数成分が混在している。しかし、これらは活性が市販リモニンよりも上回る活性を有しており今後、単離した配糖体での活性評価を行い、活性の高い成分を見出し評価したいと考える。

また、抽出した配糖体はチロシナーゼ活性を全く示さないことから、細胞を使った *in vitro* での活性評価を行い、美白効果があるのかを検討していきたい。私たちの配糖体は酸素呼吸に関して、高い抗酸化能を有することが確認できた。これらのことより、ユズ種子中のリモノイド類は脂溶性のアグリコンと水溶性の配糖体のそれぞれの特性を生かし、食品や医薬品など幅広い方面に新規の機能性材料としての応用が大いに期待できるだろう。

7. 参考文献

- 1) M. Minamisawa, H minamisawa, S Yoshida and N Takai, "Characterization of absorption gels prepared from plant biomaterials", *Green Chem*, 7, 595-601 (2005)
- 2) M.Sawamura."Aroma and functional properties of Japanese yuzu (Citrus junos Tanaka) essential oil.", *AROMA RESEARCH Vol.1*, No.1 (2000)
- 3) 朝日新聞, 2005, 9.18 (日), P3,6
- 4) M. Minamisawa, H minamisawa, S .Yoshida and N. Takai,"International hydrocolloid conference, Melborune in Australia 2004, 8.31"
- 5) H Ohta, C.H.Fong, M Berhow and S Hasegawa,"Thin-layer and higt-peformance liquid chromatographic analyses of limonoids and limonoid glucosides in *Citrus* seeds.", *J.Chromatogr. 639*, 295-302 (1993)
- 6) 三宅 正起、長谷川 信、"カンキツリモノイドの生化学と生理活性"
- 7) M.Juichi,"Chemical Study of Citrus Plants in the Search for Cancer Chemopreventive Agents.", *YAKUGAKU ZASSHI 125 (3)*, 231-254 (2005)
- 8) E.G.Miller,et al."Inhibition of Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis by Limonin 17- β -D-Glucopyranoside.", *Nutrition and Cancer* (1992)
- 9) Luke K.T.Lam, Ying Li and S Hasegawa, Effects of Citrus Limonoids on Glutathione S-Transferase Activity in Mice
- 10) V.P Maier and E.R. Grant, *J.Agric. Food Chem*, 18 250 (1970)
- 11) J.H.Tatum and R. E.Berry,*J.Food Sci.*,38 1244 (1973)
- 12) H.Ohta,A.Watanabe,K.lino and Kimura,*J.Jap.Soc.Food Sci.Technol.* (*Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*),28, 91 (1981)
- 13) J.F.Fisher,*J.Agric Food Chem.*23.1199 (1975)

- 14) J.F.Fisher, *J.Agric Food Chem.* 23,497 (1978)
- 15) R.L.Rouseff and J.F.Fisher, *Anal. Chem.*, 52 .1228 (1980)
- 16) P.E.Shaw and C.W.Wilson, *J.Food Sci*, 49 1216 (1984)
- 17) T.A.Van Beek and A.Blaakmeer, *J.Chromatogr.*, 464.375 (1989)
- 18) S.Hasegawa, R.D.Bennett, Z.Herman, C.H.Fong and P.Ou, *Phytochemistry*, 28, 1717 (1989)
- 19) L.K.T.Lam, Y.Li and S.Hasegawa, *J.Agric.Food Chem.*, 37,878 (1989)
- 20) L.K.T.lam, Y.Li and S.Hasegawa, *Nutrition and Cancer*, 12 43 (1989)
- 21) http://www.tmig.or.jp/J_TMIG/j_topics/topics_185_3.html (活性酸素)
- 22) 南光 弘子 監修、佐藤 拓 著、"活性酸素を減らせば肌がこんなに若返る"
- 23) 大木 道則、大沢 利昭、田中 元治、千原 秀昭 編集、"化学辞典"
- 24) 久保 亮五、長倉 三郎、井口 洋夫、江沢 洋 編集、"理化学辞典"
- 25) 今堀 和友、山川 民夫 監修、"生化学辞典"
- 26) Martha Windholz *Editor*, "THE MERCK INDEX"
- 27) <http://www.dojindo.co.jp/> (SOD Assay kit-WST)
- 28) <http://www.h7.dion.ne.jp/> (活性酸素・フリーラジカルの種類)
- 29) 高橋篤子、堀口亜由美、"DPPH による食品素材中の抗酸化物質の構造活性相関に関する研究"
- 30) 武田 克之、原田 昭太郎、安藤 正典、"化粧品の有効性—評価技術の進歩と将来展望—"

- 31) M.N.Gould."Cancer Chemoprevention and Therapy by Monoterpenes."
Environmental Health Perspectives vol.105, Supplement 4 June 1997
- 32) C.Kamei.,M Sugiura."New Pharmacological Functions of Luo Han Guo."
FFI JOURNAL, Vol.210,No.3,2005
- 33) <http://hobab.fc2web.com/sub2-kasseisanso.html> (活性酸素)
- 34) <http://www.h7.dion.ne.jp/> (活性酸素と抗酸化食品)
- 35) <http://www.kishida.co.jp/life/seikagaku/seikagaku02a.html>
(グット緩衝液の調製方法)
- 36) <http://www.imagnet.ne.jp/> (ラジカルスカベンジャー作用)
- 37) <http://www.wdic.org/> (尿酸・キサンチン)
- 38) <http://www.hokendojin.co.jp/> (Net-SOD)
- 39) 橋本 庸平 著、"薄層クロマトグラフィー"
- 40) <http://www.246.ne.jp/> (糖質 [saccharide])
- 41) 社団法人 日本化学会 編集、"化学便覧 基礎編"

8. 謝辞

最後になりましたが、本研究を行うにあたり多大なるご指導、ご鞭撻をいただきました機器分析専攻コースの南澤磨優寛先生、高井信治先生、吉田章一郎先生、今井亜希子先生、ご協力いただいた講師の先生方、3年間通してサポートしてくださった諸先生方に厚く御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

9. 付録 生理活性測定データ

SOD様活性作用試験の測定データ

<計算方法>

$$\text{抑制率 (\%)} = 1 - (\text{St} - \text{Sb}) / (\text{Ct} - \text{Cb}) \times 100$$

St: サンプルのテスト (キサントキシダーゼ添加) の吸光度

Sb: サンプルのブランク (キサントキシダーゼ無添加) の吸光度

Ct: コントロール (サンプルの代わりに蒸留水添加、

キサントキシダーゼ添加) の吸光度

Cb: コントロールのブランク (サンプルの代わりに蒸留水添加、

キサントキシダーゼ無添加) の吸光度

サンプル名 : バイカリン

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.228	0.158	0.245	0.006	68.8
50	0.448	0.449	0.216	0.007	90.8
100	0.478	0.425			76.3
150	0.560	0.514			79.5
200	0.547	0.480			70.1
		平均	0.231	0.007	

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.251	0.166	0.227	0.009	67.2
50	0.449	0.436	0.224	0.020	93.8
100	0.472	0.520			87.9
150	0.497	0.546			87.7
200	0.545	0.607			80.5
		平均	0.226	0.015	

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.252	0.193	0.265	0.002	67.2
50	0.468	0.460	0.255	0.007	96.9
100	0.423	0.474			87.9
150	0.508	0.535			87.7
200	0.534	0.544			80.5
		平均	0.260	0.005	

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.238	0.166	0.199	0.006	63.5
50	0.422	0.386	0.207	0.006	81.7
100	0.440	0.439			99.5
150	0.491	0.483			95.9
200	0.509	0.491			90.9
		平均	0.203	0.006	

SOD様活性作用試験の測定データ

サンプル名：配糖体

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.208	0.018	0.216	0.007	8.9
50	0.217	0.063	0.216	0.008	14.1
100	0.313	0.118			24.9
150	0.337	0.174			28.3
200	0.396	0.257			33.3
		平均	0.216	0.008	

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.217	0.021	0.204	0.012	3.2
50	0.252	0.076	0.220	0.007	13.1
100	0.284	0.127			22.5
150	0.340	0.204			32.8
200	0.405	0.255			25.9
		平均	0.212	0.010	

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.228	0.019	0.212	0.007	4.5
50	0.236	0.070	0.211	0.008	18.6
100	0.250	0.127			24.9
150	0.318	0.185			34.8
200	0.397	0.253			29.4
		平均	0.212	0.008	

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.226	0.021	0.213	0.008	1.4
50	0.257	0.071	0.217	0.006	10.6
100	0.304	0.122			12.5
150	0.350	0.191			23.6
200	0.407	0.251			25.0
		平均	0.215	0.007	

SOD様活性作用試験の測定データ

サンプル名：リモニン

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.183	0.007	0.230	0.007	18.7
50	0.175	0.008	0.216	0.006	22.9
100	0.199	0.026			20.1
150	0.187	0.019			22.4
200	0.238	0.075			24.7
		平均	0.223	0.007	

SOD様活性作用試験の測定データ

サンプル名：羅漢果

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.234	0.023	0.246	0.010	14.4
50	0.205	0.022	0.264	0.007	25.8
100	0.206	0.036			31.0
150	0.207	0.045			34.3
200	0.201	0.060			42.8
		平均	0.255	0.009	

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.207	0.012	0.255	0.005	13.6
50	0.181	0.018	0.255	0.008	23.7
100	0.193	0.032			31.0
150	0.174	0.045			33.5
200	0.182	0.057			42.1
		平均	0.255	0.007	

濃度 (ppm)	St	So	Bt	Bo	抑制率 (%)
10	0.199	0.010	0.219	0.008	12.7
50	0.186	0.016	0.231	0.009	21.5
100	0.183	0.032			30.3
150	0.189	0.043			32.6
200	0.181	0.054			41.3
		平均	0.225	0.009	

過酸化水素消去試験の測定データ

〈計算方法〉

$$\text{抑制率 (\%)} = \{1 - (C - D) / (A - B)\} \times 100$$

A : 標準溶液の発色後の 727 nm での吸光度

B : 標準溶液の発色前の 727 nm での吸光度

C : 試料溶液の発色後の 727 nm での吸光度

D : 試料溶液の発色前の 727 nm での吸光度

サンプル名 : バイカリン

A	0.132	B	-0.002
	0.149		-0.002
平均 A	0.1405	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.004	-0.002	95.8
50	0.022	0	84.6
100	0.034	-0.003	74.0
150	0.068	-0.004	49.5
200	0.08	-0.005	40.4

平均 A	0.1405	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.004	-0.002	95.8
50	0.019	-0.002	85.3
100	0.029	-0.003	77.5
150	0.059	-0.004	55.8
200	0.078	-0.004	42.5

平均 A	0.1405	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.007	-0.002	93.7
50	0.023	-0.001	83.2
100	0.038	-0.003	71.2
150	0.065	-0.004	51.6
200	0.08	-0.002	42.5

平均 A	0.1405	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.004	-0.003	95.1
50	0.018	-0.001	86.7
100	0.021	-0.003	83.2
150	0.064	-0.004	52.3
200	0.08	-0.004	41.1

平均 A	0.1405	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.005	-0.002	95.1
50	0.023	-0.001	83.2
100	0.037	-0.003	71.9
150	0.053	-0.003	60.7
200	0.054	-0.004	59.3

平均	
濃度 (ppm)	抑制率 (%)
0	0.0
10	95.1
50	84.6
100	75.6
150	54.0
200	45.1

過酸化水素消去試験の測定データ

サンプル名：配糖体

A	0.125	B	0.001
	0.134		0
平均 A	0.1295	平均 B	0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0
10	0.152	0.015	-6.2
50	0.104	0.071	74.4
100	0.137	0.137	100.0

平均 A	0.1295	平均 B	0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0
10	0.106	0.016	30.2
50	0.096	0.072	81.4
100	0.147	0.147	100.0

平均 A	0.1295	平均 B	0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0
10	0.132	0.015	9.3
50	0.098	0.046	59.7
100	0.14	0.125	88.4

平均 A	0.1295	平均 B	0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0
10	0.106	0.016	30.2
50	0.089	0.073	87.6
100	0.142	0.137	96.1

平均 A	0.1295	平均 B	0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0
10	0.155	0.016	-7.8
50	0.102	0.075	79.1
100	0.146	0.137	93.0

平均	
濃度 (ppm)	抑制率 (%)
0	0
10	30.2
50	80.6
100	97.3

過酸化水素消去試験の測定データ

サンプル名：リモニン

A	0.114	B	-0.001
	0.124		-0.003
平均 A	0.119	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.126	-0.001	-5.0
50	0.165	0.015	-24.0
100	0.181	0.042	-14.9

平均 A	0.119	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.136	-0.002	-14.0
50	0.16	0.013	-21.5
100	0.175	0.031	-19.0

平均 A	0.119	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.199	-0.001	-65.3
50	0.17	0.011	-31.4
100	0.183	0.032	-24.8

平均 A	0.119	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.146	-0.001	-21.5
50	0.173	0.01	-34.7
100	0.198	0.031	-38.0

平均 A	0.119	平均 B	-0.002
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.142	-0.001	-18.2
50	0.162	0.009	-26.4
100	0.19	0.038	-25.6

平均	
濃度 (ppm)	抑制率 (%)
0	0.0
10	-24.8
50	-27.6
100	-24.5

過酸化水素消去試験の測定データ

サンプル名：羅漢果

A	0.133	B	-0.001
	0.129		0
平均 A	0.131	平均 B	-0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.109	0.002	18.6
50	0.006	-0.001	94.7
100	0.007	-0.001	93.9
150	0.006	-0.002	93.9
200	0.006	-0.002	93.9

平均 A	0.131	平均 B	-0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.094	0.001	29.3
50	0.035	-0.001	72.6
100	0.009	-0.001	92.4
150	0.003	-0.002	96.2
200	0.002	-0.002	97.0

平均 A	0.131	平均 B	-0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.098	0.002	27.0
50	0.033	-0.001	74.1
100	0.007	-0.001	93.9
150	0.003	-0.001	97.0
200	0.002	-0.002	97.0

平均 A	0.131	平均 B	-0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.102	0	22.4
50	0.044	-0.001	65.8
100	0.006	-0.001	94.7
150	0.002	-0.002	97.0
200	0.002	-0.002	97.0

平均 A	0.131	平均 B	-0.0005
濃度 (ppm)	吸光度 C	吸光度 D	抑制率 (%)
0	0	0	0.0
10	0.101	0.002	24.7
50	0.037	-0.001	71.1
100	0.007	-0.001	93.9
150	0.002	-0.002	97.0
200	0.001	-0.002	97.7

平均	
濃度 (ppm)	抑制率 (%)
0	0.0
10	25.9
50	75.7
100	93.8
150	96.2
200	96.5

DPPH に対するラジカル消去試験の測定データ

<計算方法>

$$\text{DPPH 消去率 (\%)} = \{A - (B - C)\} / A \times 100$$

A : 1.5×10^{-4} M DPPH methanol溶液の520 nmでの吸光度

B : 試料溶液の520 nmでの吸光度

C : 試料溶液とメタノールの等量混合溶液の 520 nmでの吸光度

サンプル名 : アスコルビン酸

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.524	0.027	0	98.2
50	1.524	0.026	0	98.3
100	1.524	0.027	0	98.2
150	1.524	0.028	0	98.2
200	1.524	0.027	0	98.2

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.565	0.028	0.001	98.3
50	1.565	0.027	-0.001	98.2
100	1.565	0.025	-0.002	98.3
150	1.565	0.027	0.001	98.3
200	1.565	0.027	0	98.3

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.524	0.039	0	97.4
50	1.524	0.028	-0.002	98.0
100	1.524	0.029	0	98.1
150	1.524	0.029	-0.001	98.0
200	1.524	0.03	-0.003	97.8

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.565	0.028	-0.003	98.0
50	1.565	0.031	-0.005	97.7
100	1.565	0.025	-0.003	98.2
150	1.565	0.027	0	98.3
200	1.565	0.027	0	98.3

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.524	0.028	-0.002	98.0
50	1.524	0.028	0	98.2
100	1.524	0.027	-0.002	98.1
150	1.524	0.025	-0.002	98.2
200	1.524	0.03	0.001	98.1

平均	
濃度 (ppm)	阻害率 (%)
10	98.0
50	98.1
100	98.2
150	98.2
200	98.1

DPPH に対するラジカル消去試験の測定データ

サンプル名：配糖体

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.401	0.711	0.017	50.5
50	1.401	0.761	0.05	49.3
100	1.401	0.826	0.153	52.0
150	1.401	0.878	0.234	54.0
200	1.401	0.948	0.296	53.5

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.401	0.713	0.012	50.0
50	1.401	0.772	0.079	50.5
100	1.401	0.834	0.147	51.0
150	1.401	0.902	0.214	50.9
200	1.401	0.943	0.284	53.0

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.401	0.71	0.013	50.2
50	1.401	0.765	0.065	50.0
100	1.401	0.798	0.151	53.8
150	1.401	0.891	0.215	51.7
200	1.401	0.945	0.285	52.9

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.395	0.719	0.016	49.6
50	1.395	0.767	0.059	49.2
100	1.395	0.84	0.138	49.7
150	1.395	0.889	0.175	48.8
200	1.395	0.942	0.292	53.4

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.395	0.71	0.012	50.0
50	1.395	0.767	0.075	50.4
100	1.395	0.833	0.145	50.7
150	1.395	0.887	0.215	51.8
200	1.395	0.947	0.327	55.6

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.395	0.708	0.02	50.7
50	1.395	0.758	0.073	50.9
100	1.395	0.825	0.167	52.8
150	1.395	0.895	0.234	52.6
200	1.395	0.956	0.3	53.0

		平均
濃度 (ppm)	阻害率 (%)	
10	50.2	
50	50.1	
100	51.7	
150	51.7	
200	53.5	

DPPH に対するラジカル消去試験の測定データ

サンプル名：リモニン

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.452	0.726	-0.001	49.9
50	1.452	0.699	0	51.9
100	1.452	0.696	-0.001	52.0
150	1.452	0.719	0.006	50.9
200	1.452	0.714	0.012	51.7

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.464	0.729	-0.001	50.1
50	1.464	0.731	-0.001	50.0
100	1.464	0.718	0.005	51.3
150	1.464	0.731	0.015	51.1
200	1.464	0.732	0.01	50.7

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.452	0.71	-0.002	51.0
50	1.452	0.726	0.002	50.1
100	1.452	0.716	-0.001	50.6
150	1.452	0.72	0.002	50.6
200	1.452	0.713	0.005	51.2

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.464	0.72	-0.001	50.8
50	1.464	0.724	0	50.5
100	1.464	0.717	0.005	51.4
150	1.464	0.719	0.015	51.9
200	1.464	0.732	0.01	50.7

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.452	0.71	-0.002	51.0
50	1.452	0.726	0.001	50.1
100	1.452	0.716	0.004	51.0
150	1.452	0.72	0.005	50.8
200	1.452	0.713	0.009	51.5

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.464	0.726	-0.001	50.3
50	1.464	0.699	0.001	52.3
100	1.464	0.709	0.003	51.8
150	1.464	0.718	0.014	51.9
200	1.464	0.705	0.0012	51.9

		平均
濃度 (ppm)	阻害率 (%)	
10	50.5	
50	50.8	
100	51.3	
150	51.2	
200	51.3	

DPPH に対するラジカル消去試験の測定データ

<計算方法>

$$\text{DPPH 消去率 (\%)} = \{A - (B - C)\} / A \times 100$$

A : 1.5×10^{-4} M DPPH methanol溶液の520 nmでの吸光度

B : 試料溶液の520 nmでの吸光度

C : 試料溶液とメタノールの等量混合溶液の 520 nmでの吸光度

サンプル名 : アスコルビン酸

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.524	0.027	0	98.2
50	1.524	0.026	0	98.3
100	1.524	0.027	0	98.2
150	1.524	0.028	0	98.2
200	1.524	0.027	0	98.2

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.565	0.028	0.001	98.3
50	1.565	0.027	-0.001	98.2
100	1.565	0.025	-0.002	98.3
150	1.565	0.027	0.001	98.3
200	1.565	0.027	0	98.3

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.524	0.039	0	97.4
50	1.524	0.028	-0.002	98.0
100	1.524	0.029	0	98.1
150	1.524	0.029	-0.001	98.0
200	1.524	0.03	-0.003	97.8

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.565	0.028	-0.003	98.0
50	1.565	0.031	-0.005	97.7
100	1.565	0.025	-0.003	98.2
150	1.565	0.027	0	98.3
200	1.565	0.027	0	98.3

濃度 (ppm)	A	B	C	阻害率 (%)
10	1.377	0.645	0	53.2
50	1.377	0.548	0.003	60.4
100	1.377	0.429	0.006	69.3
150	1.377	0.326	0.01	77.1
200	1.377	0.24	0.01	83.3

		平均
濃度 (ppm)	阻害率 (%)	
10	52.6	
50	60.7	
100	69.6	
150	77.4	
200	83.5	

チロシナーゼ阻害活性試験の測定データ

<計算方法>

$$\text{阻害率 (\%)} = 1 - (\text{St} - \text{Sb}) / (\text{Ct} - \text{Cb}) \times 100$$

St : サンプルのテスト (チロシナーゼ添加) の吸光度

Sb : サンプルのブランク (チロシナーゼ無添加) の吸光度

Ct : コントロール (サンプルの代わりにエタノール添加) の吸光度

Cb : コントロールのブランク (チロシナーゼ無添加) の吸光度

サンプル名 : アスコルビン酸

濃度 (ppm)	Ct	0.103	St	Cb	0.005	阻害率 (%)
10	0.155	0.002	-56.1			
50	0.005	0.001	95.9			
100	0.005	0.001	95.9			
150	0.002	0.003	101.0			
200	0.002	0.003	101.0			

濃度 (ppm)	Ct	0.101	St	Cb	0.003	阻害率 (%)
10	0.145	0.003	-44.9			
50	0.007	0.002	94.9			
100	0.006	0.004	98.0			
150	0.003	0.003	100.0			
200	0.004	0.003	99.0			

濃度 (ppm)	Ct	0.1	St	Cb	0.002	阻害率 (%)
10	0.144	0	-46.9			
50	0.004	0.001	96.9			
100	0.004	0.001	96.9			
150	0.001	0.001	100.0			
200	0	0.001	101.0			

濃度 (ppm)	Ct	0.082	St	Cb	0.001	阻害率 (%)
10	0.127	0.001	-55.6			
50	0.006	0.001	93.8			
100	0.003	0.004	101.2			
150	0.003	0.003	1.0			
200	0.004	0.003	98.8			

濃度 (ppm)	Ct	0.093	St	Cb	0.001	阻害率 (%)
10	0.13	0.003	-38.0			
50	0.004	0.002	97.8			
100	0.003	0.002	98.9			
150	0.003	0.002	98.9			
200	0.004	0.002	97.8			

濃度 (ppm)	Ct	0.077	St	Cb	0.004	阻害率 (%)
10	0.128	0.003	-71.2			
50	0.006	0.005	98.6			
100	0.008	0.005	95.9			
150	0.003	0.005	102.7			
200	0.005	0.004	98.6			

平均	
濃度 (ppm)	阻害率 (%)
10	-52.1
50	96.3
100	97.8
150	83.9
200	99.4

チロシナーゼ阻害活性試験の測定データ

サンプル名：配糖体

Ct	0.074	Cb	0.002
	0.062		0.003
平均 Ct	0.068	平均 Cb	0.003
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.113	0.019	-44.6
50	0.176	0.08	-47.7
100	0.254	0.167	-33.8
150	0.41	0.318	-41.5
200	0.471	0.318	-135.4

Ct	0.019	Cb	-0.001
	0.06		0
平均 Ct	0.06	平均 Cb	0
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.134	0.011	-105.0
50	0.2	0.086	-90.0
100	0.281	0.162	-98.3
150	0.412	0.284	-113.3
200	0.445	0.332	-88.3

Ct	0.074	Cb	0.005
	0.065		0.004
平均 Ct	0.0695	平均 Cb	0.0045
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.135	0.024	-70.8
50	0.205	0.08	-92.3
100	0.281	0.157	-90.8
150	0.386	0.295	-40.0
200	0.416	0.325	-40.0

Ct	0.031	Cb	0.002
	0.031		0.003
平均 Ct	0.031	平均 Cb	0.0025
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.093	0.011	-187.7
50	0.145	0.075	-145.6
100	0.228	0.144	-194.7
150	0.343	0.29	-86.0
200	0.424	0.318	-271.9

Ct	0.067	Cb	0.003
	0.068		0.003
平均 Ct	0.0675	平均 Cb	0.003
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.132	0.018	-76.7
50	0.189	0.079	-70.5
100	0.265	0.151	-76.7
150	0.404	0.308	-48.8
200	0.463	0.316	-127.9

Ct	0.031	Cb	0.002
	0.031		0.003
平均 Ct	0.031	平均 Cb	0.0025
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.094	0.011	-191.2
50	0.147	0.08	-135.1
100	0.234	0.155	-177.2
150	0.354	0.293	-114.0
200	0.434	0.327	-275.4

平均	
濃度 (ppm)	阻害率 (%)
10	-112.7
50	-96.9
100	-111.9
150	-74.0
200	-156.5

チロシナーゼ阻害活性試験の測定データ

サンプル名：リモニン

Ct	0.091	Cb	0.005
	0.084		0.003
平均 Ct	0.0875	平均 Cb	0.004
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.156	0.003	-83.2
50	0.145	-0.002	-76.0
100	0.18	0.018	-94.0
150	0.159	0.02	-66.5
200	0.218	0.072	-74.9

Ct	0.091	Cb	0.005
	0.084		0.003
平均 Ct	0.0875	平均 Cb	0.004
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.159	0.002	-47.4
50	0.163	0.006	-47.4
100	0.176	0.02	-46.5
150	0.184	0.042	-33.3
200	0.227	0.045	-70.9

Ct	0.081	Cb	0.001
	0.092		0.002
平均 Ct	0.0865	平均 Cb	0.0015
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.146	0	-71.8
50	0.145	0.003	-67.1
100	0.177	0.022	-82.4
150	0.163	0.03	-56.5
200	0.195	0.054	-65.9

Ct	0.077	Cb	-0.001
	0.071		0.004
平均 Ct	0.074	平均 Cb	0.0015
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.131	0.003	-76.6
50	0.149	0.011	-90.3
100	0.176	0.028	-104.1
150	0.211	0.045	-129.0
200	0.214	0.079	-86.2

Ct	0.096	Cb	-0.002
	0.099		0
平均 Ct	0.0975	平均 Cb	-0.001
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.156	-0.001	-59.4
50	0.165	0.005	-62.4
100	0.161	0.028	-35.0
150	0.159	0.033	-27.9
200	0.247	0.05	-100.0

Ct	0.084	Cb	0.002
	0.092		0.002
平均 Ct	0.088	平均 Cb	0.002
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.125	0.002	-43.0
50	0.141	0.007	-55.8
100	0.166	0.022	-67.4
150	0.212	0.039	-101.2
200	0.217	0.07	-70.9

平均	
濃度 (ppm)	阻害率 (%)
10	-63.6
50	-66.5
100	-71.6
150	-69.1
200	-78.1

チロシナーゼ阻害活性試験の測定データ

サンプル名：羅漢果

Ct	0.363	Cb	0
	0.343		0.001
	0.403		0.003
平均 Ct	0.370	平均 Cb	0.001
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.478	0.01	-27.1
50	0.479	0.004	-29.0
100	0.486	0.016	-27.6
150	0.513	0.023	-33.0
200	0.534	0.031	-36.6

Ct	0.363	Cb	0
	0.343		0.001
	0.403		0.003
平均 Ct	0.370	平均 Cb	0.001
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.443	0.005	-18.9
50	0.467	0.009	-24.3
100	0.475	0.018	-24.1
150	0.487	0.024	-25.7
200	0.496	0.03	-26.5

Ct	0.368	Cb	0.001
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.459	0.005	-23.3
50	0.499	0.009	-33.0
100	0.507	0.016	-33.3
150	0.496	0.025	-27.9
200	0.53	0.033	-34.9

Ct	0.368	Cb	0.001
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.454	0.011	-20.3
50	0.469	0.014	-23.5
100	0.467	0.024	-20.3
150	0.488	0.03	-24.3
200	0.5	0.033	-26.8

Ct	0.368	Cb	0.001
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.451	0.006	-20.8
50	0.476	0.009	-26.8
100	0.506	0.017	-32.8
150	0.501	0.023	-29.8
200	0.527	0.033	-34.1

Ct	0.368	Cb	0.001
濃度 (ppm)	St	Sb	阻害率 (%)
10	0.443	0.006	-18.6
50	0.478	0.014	-26.0
100	0.494	0.026	-27.1
150	0.512	0.027	-31.7
200	0.517	0.033	-31.4

平均	
濃度 (ppm)	阻害率 (%)
10	-21.5
50	-27.1
100	-27.5
150	-28.7
200	-31.7