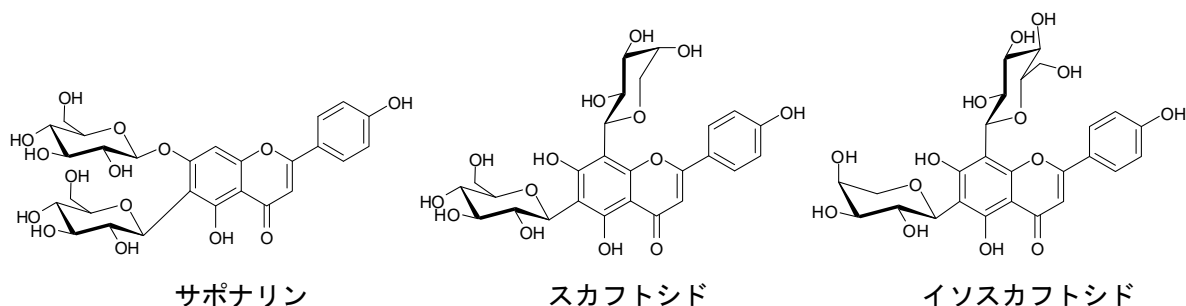


沖縄産黒糖に含まれるフラボン配糖体

萩貴之、前田剛希*

沖縄の伝統食品である黒糖は、サトウキビ由来や製造工程中に生じる有用成分を含み、これまでに抗酸化能等の各種機能が報告されている。今回、我々は沖縄産黒糖から 3 種類のフラボン配糖体（サボナリン、スカフトシド、イソスカフトシド）を単離同定した。また、黒糖は原料のサトウキビ品種間に差があること、県内 7 か所の含蜜糖工場で製造工程に違いがあることから、黒糖中の機能性成分にも差異があると考えられた為、3 種類のフラボン配糖体の LC/MS 定量法を検討した。



1 はじめに

沖縄県の特産物である黒糖は、伝統食品というだけでなく、疲労回復や血圧上昇抑制など様々な効果が謳われている健康イメージの強い食品である。黒糖は、サトウキビ由来や製造工程中に生じる有用成分を含んでおり、これまでに、抗酸化作用を持つフェノール性化合物が報告されている^{1),2)}。また、黒糖の原料であるサトウキビからも、多くのフラボノイド類が報告されており³⁾、黒糖中には、まだ報告されていない抗酸化物質が多く含まれていると推測される。

そこで本研究は、沖縄産黒糖の機能性を明らかにすることを目的として、抗酸化物質の特定および定量法の確立を行い、県内各工場の純黒糖と外国産黒糖、加工糖、原料蔗汁中の抗酸化物質の含量を比較検討した。

2 実験材料および方法

2-1 試薬および機器

黒糖の非ショ糖画分の調製は、合成吸着剤 DIAION[®] HP20 (三菱化学) を充填したオープンカラムクロマト管 (100 x 700 mmI.D.) を用いた。分取 HPLC は、送液システム (600E Multi Solvent Delivery System, Waters)、逆相カラム (YMC-Pack ODS-A, 20 x 150 mmI.D., YMC-Pack ODS-AQ, 20 x 250 mmI.D., YMC-Pack ODS-A, 10 x 150 mmI.D.) を使用し、紫外可視吸光検出器 (2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters) により 280 nm および 330 nm

で検出を行った。LC/MS による分析は、送液システム (Alliance[®] 2690 Separations Module, Waters)、逆相カラム (YMC-Pack ODS-AQ, 3.0 x 150 mmI.D.)、フォトダイオードアレイ検出器 (996 Photodiode Array Detector, Waters)、四重極型質量分析装置 (Micromass ZQ Detector, Waters) を用いた。移動相は、ギ酸、超純水、メタノール、アセトニトリルを使用した。¹H-、¹³C-および 2D-NMR スペクトルは JNM-LA400 (日本電子) で測定し、DMSO-*d*₆ の溶媒シグナル (δ_H 2.49, δ_C 39.5) を基準として用いた。マイクロプレートリーダーは、Model 550 Microplate Reader (BioRad) を使用した。MES (2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate)、Trolox、DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) およびギ酸 (LC/MS グレード) は和光純薬工業 (株) から購入した。その他全ての試薬は、特級試薬を用いた。

2-2 DPPH ラジカル消去能

DPPH ラジカル消去活性は沖ら⁴⁾の方法に準じて測定した。すなわち、96 穴マイクロプレートに段階的に希釈した試料溶液、0.2 M MES 緩衝液 (pH 6.0)、20% エタノールをそれぞれ 50 μ L 入れ、0.8 M DPPH 溶液 50 μ L を加えて攪拌し、室温で 20 分間放置後、マイクロプレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定した。DPPH ラジカル消去能は、Trolox 相当量として算出した。

2-3 化合物 1-3 の分離と精製

試料は、2006 年度に県内で生産された純黒糖を用いた。図 1 に示すように、黒糖 4.7 kg を水に溶かし、DIAION[®] HP20

* 現沖縄県農業研究センター

に吸着させ、水で洗浄後、メタノール濃度 (V/V) を段階的に変えて溶出し非ショ糖画分を得た (20、40、60、80、100% メタノール溶出画分)。溶出画分の抗酸化能を DPPH ラジカル法により測定したところ、20~60% メタノール溶出画分に活性が確認されたため、抗酸化活性を指標に分画を行った。最も活性の強い 40% メタノール溶出画分を減圧濃縮し、メタノール除去後、水 (500 mL) と酢酸エチル (200 mL x 1, 100mL x 2) で分液し、さらに水層を水 (500 mL) とブタノール (200 mL x 1, 100mL x 2) で分液した。

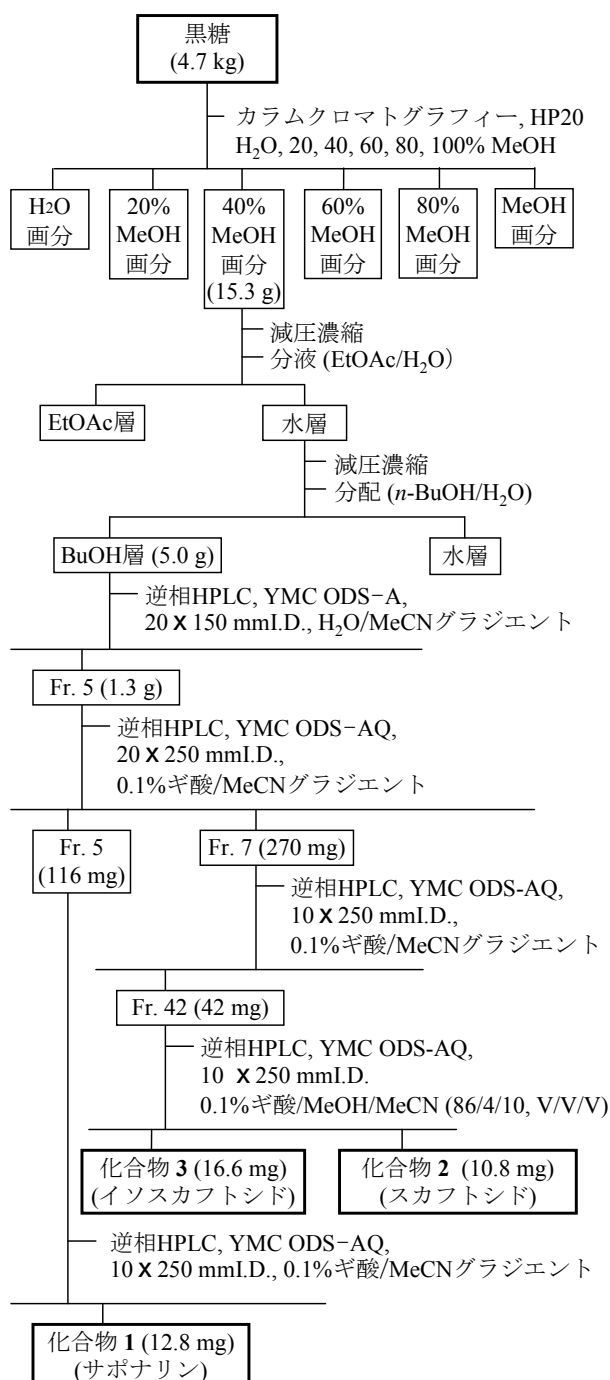


図 1 フラボン配糖体 (化合物 1-3) の分離過程

得られたブタノール層 (5.0 g) を逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による粗分画を行い Fr. 5 (1.3 g) を得た。Fr. 5 を LC/MS により分析したところ ESI ネガティブモードで m/z 593 (M-H)⁻、および m/z 563 (M-H)⁻ に検出されるピークが含まれていた。Fr. 5 をさらに、逆相 HPLC で分画し、Fr. 5-5 (116 mg)、Fr. 5-7 (270 mg) を得た。分取した Fr. 5-5 を逆相 HPLC で精製し、化合物 1 (12.8 mg) を単離した。Fr. 5-7 はさらに逆相 HPLC によって精製し、化合物 2 (10.8 mg) および 3 (16.6 mg) を単離した。

2-4 NO 産生抑制作用

NO 産生抑制能の測定は、村上らの方法⁵⁾ を一部改変して次のとおりに行った。RAW 264.7 マウスマクロファージ細胞 (大日本住友製薬) を、 2.5×10^5 cells/mL の濃度で 96 穴のマクロプレートに播種、一晚培養した。培地を除去後、新鮮培地 200 μ L に LPS (10 μ g/mL) と IFN- γ (200 mM), L-arginin (104 U/mL) をそれぞれ 2 μ L ずつ加え、黒糖フラボン配糖体を終濃度 25, 50, 100 μ M になるように DMSO に溶かして添加、16 時間培養した。培養終了後、RAW264.7 細胞が産生した培地中の NO を、NO₂/NO₃ Assay Kit-CII (同人化学) を用いて Griess 法で測定した。

2-5 黒糖と蔗汁に含まれるフラボン配糖体の定量

2-4-1 分析試料

分析試料は、2006 年 10 月と平 2007 年 1 月に収穫した 4 品種 (NiF8、Ni9、F177、NC030) のサトウキビ搾汁、県内の 7 工場で製造された 2006 年産純黒糖 (工場 A~F)、3 社で製造された 6 種類の加工糖および外国で製造された 2 種類の 2006 年度産黒糖を用いた。

2-4-2 前処理

サトウキビ搾汁液は水で 10 倍に希釈 (0.1 g/mL)、黒糖は、水で 100 倍に希釈 (0.01 g/mL) を行い、メンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過し、LC/MS の分析に用いた。

2-4-3 LC/MS の分析条件

LC/MS は次の条件で分析した。カラム温度; 35°C、流速; 0.6 mL/min、移動相; 1% ギ酸/超純水/メタノール/アセトニトリル [Initial, 10/78/4/8 (V/V/V/V) \rightarrow 20 min, 10/76/4/10 (V/V/V/V) \rightarrow 40 min, 10/76/4/10 (V/V/V/V)], 注入量; 5 μ L、検出; ESI ポジティブイオンモード、イオンソース温度; 110°C、デゾルベーション温度; 350°C、キャピラリー電圧; 3.0 kV、コーン電圧; 20 V。夾雑物による検出器の感度低下を防ぐため、0~15 min までは MS 検出器に移動相が流れないように自動バルブを使用して流路を切り替え、排出した。検量線の作成は、単離したサボナリン、スカフトシド、イソスカフトシドを標準溶液として用いた。

3 結果と考察

3-1 化合物1-3の単離と同定

単離した化合物 **1** は、黄色のオイル状で、ESI-MS による分子イオンピーク m/z 595 (M+H)⁺ から分子量は、594 であると推測され、1Dと2D NMRの解析により化合物 **1** は、サボナリンと推察された。類似化合物 **1a** の文献値⁶⁾ と ¹³C-NMR スペクトルデータの詳細な比較 (表 1) により、化合物 **1** をサボナリンと同定した (図 2)。

表 1 化合物 **1**^{a)} と **1a**^{b)} の ¹³C-NMR データ比較

	1	1a		1	1a
C-2	164.2	164.2	glucoside at C-6		
C-3	103.2	101.1	C-1''	73.3	73.3
C-4	182.1	181.7	C-2''	72.7	72.6
C-5	159.4	160.1	C-3''	78.9	78.3
C-6	110.6	110.2	C-4''	69.5	69.5
C-7	162.5	162.2	C-5''	80.9	80.5
C-8	93.8	93.8	C-6''	60.7	60.6
C-9	156.5	156.2	glucoside at C-7		
C-10	104.9	104.7	C-1'''	101.2	101.1
C-1'	120.9	121.1	C-2'''	75.8	73.5
C-2'	128.6	113.0	C-3'''	77.2	74.9
C-3'	116.0	149.3	C-4'''	69.6	69.4
C-4'	161.0	159.2	C-5'''	73.8	73.3
C-5'	116.0	115.8	C-6'''	60.3	60.2
C-6'	128.6	118.6			

a) Measured in DMSO-*d*₆ at 22°C

b) Measured in DMSO-*d*₆ at 22.5°C

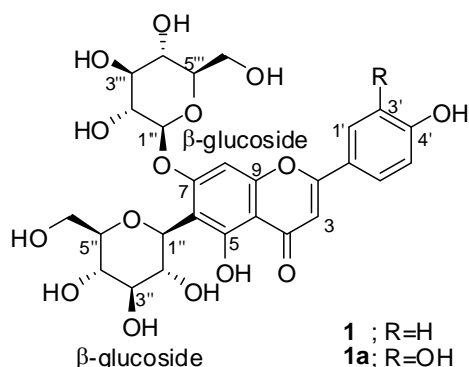


図 2 **1** と **1a** の構造

化合物 **2** は、黄色のオイル状で ESI-MS による分子イオンピーク m/z 565 (M+H)⁺ から分子量は 564 であると推測

された。NMR の解析により、アピゲニンに糖が 2 つ付加した構造であると推測され、文献値⁷⁾ と ¹³C-NMR スペクトルデータを比較し、スカフトシドと同定した。

化合物 **3** は、黄色のオイル状で ESI-MS による分子イオンピーク m/z 565 (M+H)⁺ を示した。¹H-および ¹³C-NMR では、化合物 **2** と類似したスペクトルを示した。文献値⁸⁾ と ¹³C-NMR スペクトルデータを比較し、化合物 **3** をイノスカフトシドと同定した。

3-2 NO 産生抑制作用

黒糖から、単離したフラボン配糖体の NO 産生抑制作用を図 3 に示した。3 種類のフラボン配糖体は、いずれも濃度依存的にマクロファージ由来の NO の産生を抑制した。

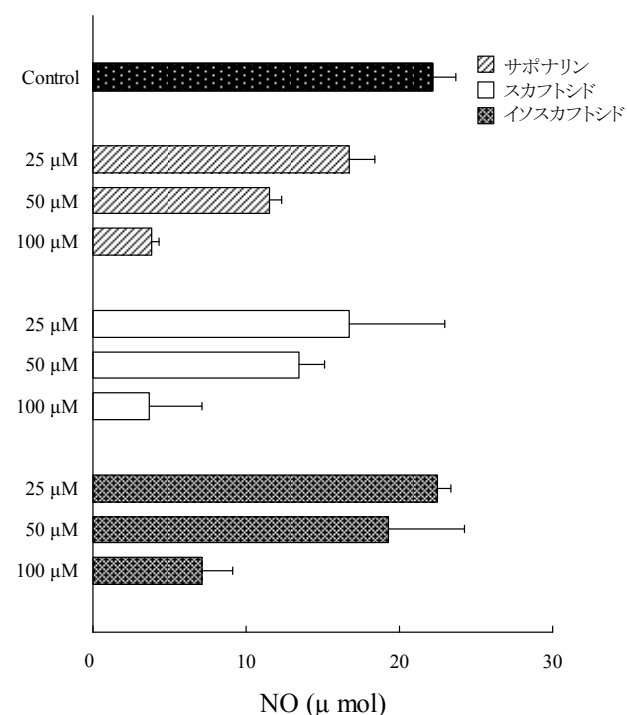


図 3 黒糖フラボン配糖体の NO 産生抑制作用

3-3 黒糖および蔗汁のフラボン配糖体の定量

サトウキビ搾汁中のフラボン配糖体量を図 4 に示した。黒糖から単離したフラボン配糖体は、サトウキビ搾汁中に検出されることから黒糖のフラボン配糖体は、原料由来であることがわかった。サトウキビの品種間および収穫時期によるフラボン配糖体の量に差は認められなかった。

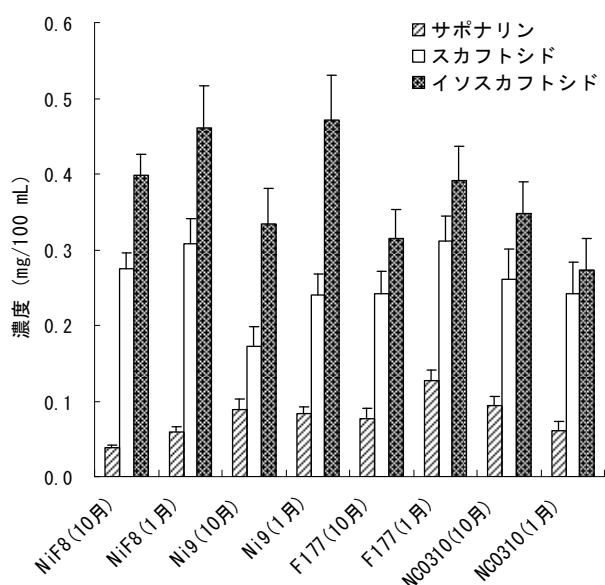


図 4 フラボン配糖体の含量 (サトウキビ品種別)

県内 7 工場で製造された黒糖 A~F のフラボン配糖体量を図 5 に示した。工場別では、サポナリンの含量に差が認められた。サトウキビから黒糖を製造する工程の歩留まりを約 15 % とすると、黒糖に含まれるフラボン配糖体の量は少なく、製造工程中で減少していると考えられる。

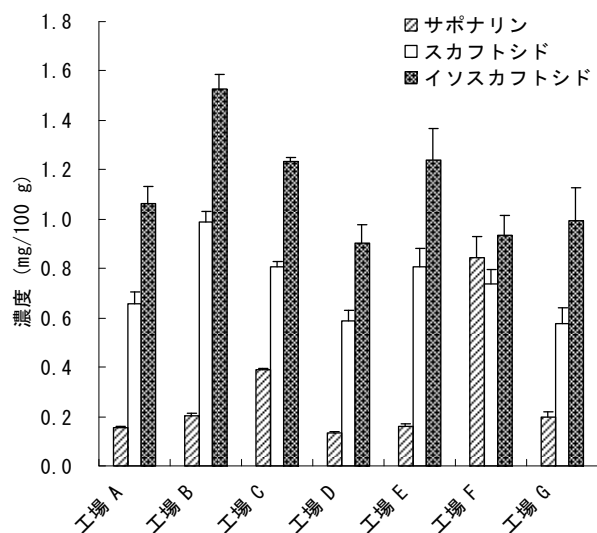


図 5 フラボン配糖体の含量 (黒糖工場別)

県内 7 工場の黒糖、6 種類の加工糖および 2 種類の外国産黒糖に含まれるフラボン配糖体含量を平均値として示した (図 6)。沖縄産の純黒糖は、外国産黒糖や加工糖と比べてフラボン配糖体が多く含まれていた。

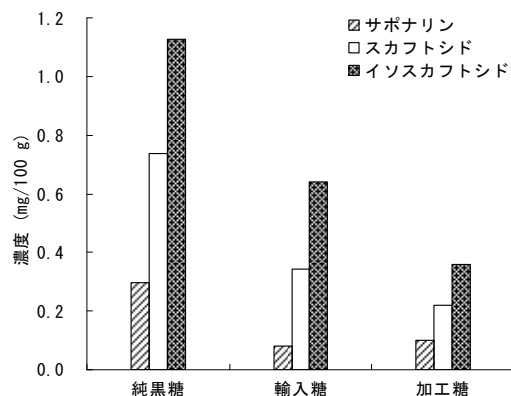


図 6 フラボン配糖体の含量

4 まとめ

黒糖の非シヨ糖画分の中で、DPPH ラジカル消去法により強い抗酸化活性を示した 40% メタノール溶出画分からサポナリン等のフラボン配糖体を単離した。また、単離したフラボン配糖体は、マクロフェージ由来の NO 産生を抑制した。黒糖に含まれるフラボン配糖体は LC/MS で簡便に定量することができ、原料のサトウキビ搾汁中にも検出された。沖縄産の純黒糖は、外国産黒糖と比べてフラボン配糖体が多く含まれており、加工糖は純黒糖に近い組成を示すものもあるが、フラボン配糖体をほとんど含まないものもあった。また、県内 7 工場のサトウキビから黒糖を製造する歩留まり (平成 18/19 年度期) は、12.2~15.6%⁸⁾ であり、この 3 種類のフラボン配糖体は、製造工程中で 50% 程度減少していると考えられる。フラボン配糖体の含量、組成は黒糖の種類で異なったことから、その他のポリフェノール類にも差があると考えられ、フラボン配糖体を含むポリフェノール類を指標とした黒糖の品質管理や分類、新商品開発等への展開の可能性が示唆された。

謝辞

本研究は、平成 17~19 年度沖縄黒糖機能性等科学的分析評価事業として当該研究を株式会社沖縄 TLO の委託により実施致しました。試料提供にご協力頂いた沖縄県黒砂糖工業会に感謝致します。

参考文献

- 1) K. Takara, D. Matsui, K. Wada, T. Ichiba and Y. Nakasone, New antioxidative phenolic glycosides isolated from kokuto non-centrifuged canesugar, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2002**, *66*, 29-35.
- 2) K. Takara, D. Matsui, K. Wada, T. Ichiba and I. chinen, New phenolic compounds from kokuto, non-centrifuged canesugar, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, *67*, 376-379.

- 3) P. Smith and N. H. Paton, Sugarcane flavonoids, *Sugar Technology Review*, **1985**, *12*, 117-142.
- 4) 沖智之, 増田真美, 古田収, 西場洋一, 須田郁夫, 紫サツマイモを原材料としたチップスのラジカル消去活性, *食科工*, **2001**, *48*, 926-932.
- 5) A. Murakami, H. Ishida, K. Kubo, I. Furukawa, Y. Ikeda, M. Yonaha, Y. Aniya and H. Ohigashi, Suppressive effects of Okinawan food items on free radical generation from stimulated leukocytes and the identification of some of their active constituents: implications for the prevention of inflammation-associated carcinogenesis, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2005**, *6*, 437-448.
- 6) R. Nørbæk, K. Brandt and T. Kondo, Identification of flavone C-glycosides including a new flavonoid improved NMR techniques, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 1703-1707.
- 7) C. Xie, N. C. Veitch, P. J. Houghton and M. S. J. Simmonds, Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino, *Chem. Pharm. Bull.*, **2003**, *51*, 1204-1207.
- 8) 株式会社 沖縄 TLO 「平成 19 年度高品質黒糖製造技術力向上支援事業 受託報告書」(2008.3)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

TEL (098)929-0111

FAX (098)929-0115

URL : <http://www.pref.okinawa.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。