

漬物に含まれるオリゴ糖、ペプチド、アントシアニンの LC/MS 及び機能性の調査研究

植村 亮太*¹
上野 義栄*²

【要 旨】

各種漬物の機能性として、血圧降下作用の指標であるアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性及び抗酸化能の指標である ORAC 値を測定した。また漬物中の機能性が期待される成分としてオリゴ糖、ジペプチド、トリペプチド、アントシアニンを対象として LC/MS を行った。オリゴ糖については、分析したすべての漬物から三糖が検出され、原料に大豆を含む漬物から四糖が検出された。検出されたジペプチド、トリペプチドの種類が多い漬物ほど ACE 阻害活性は高い傾向を示した。高い ORAC 値を示した茄子のしば漬けでは茄子由来のナスニンが抗酸化能に大きく寄与していることが示唆された。

1 はじめに

昨今全国的に漬物の販売額は右肩下がりとなっており、京都名産の漬物を生産・販売する京都府漬物協同組合もこの状況に危惧している。

販売額減少の一つの要因として、消費者の健康志向の高まりに伴い、塩分の多い漬物は高血圧に繋がるなどのイメージによる敬遠が考えられる。

そこで本研究では、漬物の健康イメージが上がることを期待して、各種漬物の機能性の分析を行い、機能性成分を対象とした LC-TOF/MS による分析を試みた。

2 実験方法

2.1 試料

試料は表 1 に示す各種漬物を ACE 阻害活性分析、ORAC 分析、LC/MS に供した。

2.2 アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性分析

2.2.1 試料前処理

表 1 に示す各種漬物のうち 7 種類 (ID 3, 5, 6,

* 1 応用技術課 技師

* 2 応用技術課 主任研究員

表 1 分析試料 (漬物)

ID	種類
1	すぐき (葉)
2	すぐき (根)
3	千枚漬
4	千枚漬 (一週間長漬)
5	奈良漬 (うり)
6	奈良漬 (きゅうり)
7	奈良漬 (守口大根)
8	奈良漬 (すいか)
9	祇園漬 (うり)
10	祇園漬 (きゅうり)
11	祇園漬 (かぶら)
12	たまり賀茂茄子
13	キムチごぼう
14	しば漬け (茄子)
15	しば漬け (胡瓜)
16	しば漬け (茄子・胡瓜 (中国産))

7, 8, 9, 12) の試料を ACE 阻害活性分析に供した。試料 10 g に蒸留水 60 mL を加え、5 分間

10,000 rpm でホモジナイズした後、4,500 rpm で5分間遠心分離を行い、その上清を取った。さらに残渣に蒸留水 10 mL を加え、同様に遠心分離を行い、この上清を先の上清と合わせた後、蒸留水で 100 mL になるようにメスアップして成分抽出液とした。

2. 2. 2 ACE 阻害活性分析

ACE 阻害活性は同仁化学製 ACE-Kit WST を用いて、同製品のプロトコルに従って行った。吸光マイクロプレートリーダーは TECAN 製 SUNRISE REMOTE を使用した。

2. 3 ORAC 分析

2. 3. 1 試料前処理

表 1 に示す全ての漬物を ORAC 分析に供した。成分抽出液の調整は 2. 2. 1 と同様に行った。

2. 3. 2 ORAC 分析

ORAC 分析は (独) 農研機構から配布された H-ORAC 分析法標準作業手順書 (2013 年 7 月) に準じて行った。蛍光マイクロプレートリーダーはコロナ電機製 SH-9000Lab を使用した。

2. 4 オリゴ糖の LC/MS

2. 4. 1 試料前処理

表 1 に示す各種漬物のうち 13 種類 (ID 1-13) の試料をオリゴ糖の LC/MS に供した。成分抽出液の調整は 2. 2. 1 と同様に行った。

ベーカーボンド spe オクタデシル(C18)スタンダード 3mL (JT ベーカー社製) にアセトニトリル 15mL、蒸留水 15mL の順に通液してコンディショニングした後、成分抽出液 3mL を通液し、ろ液を回収し、これを固相抽出液とした。

2. 4. 2 オリゴ糖の LC/MS

固相抽出液について、オリゴ糖をターゲットとした LC/MS を行った。装置は液体クロマトグラフに (株) 島津製作所製 Prominence、質量分析装置にブルカー・ダルトニクス (株) 製 micrOTOF II を使用した。分析条件はカラムにインタクト (株) 製 UnisonUK-Amino 150mm×2mm (3 μm) を用い、流速 0.2mL/min、温度 55°C で移動相は (A) 0.01% 酢酸アンモニウム水溶液、(B) アセトニトリルを表 2 に示すグラジエントで行った。イオン源は ESI を用い、ネガティブモードで行った。

表 2 オリゴ糖分析条件

時間 (分)	0	3	17	26
B (%)	91	89	89	30

2. 5 ペプチドの LC/MS

2. 5. 1 試料前処理

表 1 に示す各種漬物のうち 13 種類 (ID 1-13) の試料をペプチドの LC/MS に供した試料前処理は 2. 4. 1 と同様に行った。

2. 5. 2 ペプチドの LC/MS

固相抽出液について、ジペプチド及びトリペプチドをターゲットとした LC/MS を行った。装置は 2. 3 と同様である。分析条件はカラムにインタクト (株) 製 CadenzaCD-C18 150mm×2mm (3 μm) を用い、流速 0.2mL/min、温度 40°C で移動相は (A) 0.1% 塩酸水溶液、(B) 0.1% 塩酸添加アセトニトリルを表 3 に示すグラジエントで行った。イオン源は ESI を用い、ポジティブモードで行った。

表 3 ペプチド分析条件

時間 (分)	0	5	10	20	30
B (%)	2	2	10	70	100

2. 6 ラベル化ペプチドのLC/MS

2. 6. 1 ダブシルクロリドによるラベル化

2. 5. 1で得た固相抽出液0.5mLを含む試験管に炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH8.9)0.5mLを加えた。これにダブシルクロリドのアセトン溶液(10 μ mol/mL)1.0mLを加え、70°Cで6分間反応させた。反応後の溶液をメンブランフィルター(ADVANTEC製 DISMIC13HP)でろ過し、ダブシルクロリドラベル化LC/MS試験液とした。なお、これらの操作は遮光しながら行った。

2. 6. 2 PITCによるラベル化

エタノール：トリエチルアミン：水(7:1:1)の混液にドライアイス10gを加え、アスピレーターで軽く脱気した。これとPITC(フェニルイソチオシネート)を9:1の割合で混合し、反応混液とした。

2. 5. 1で得た固相抽出液0.25mLを含むミニナートバルブ付き試験管に反応混液0.25mLを加えて、10秒間窒素ガスを吹き込み、内部の空気を置換した後、50°Cで7分間反応させた。反応終了後、試験管をアスピレーターに接続し、50°Cで過剰の試薬及び溶媒を除去した。適当に除去した段階で残った溶液をメンブランフィルター(ADVANTEC製 DISMIC13HP)でろ過し、PITCラベル化LC/MS試験液とした。

2. 6. 3 ラベル化試験液のLC/MS

ダブシルクロリドラベル化LC/MS試験液及びPITCラベル化LC/MS試験液について2. 5. 2と同様にLC/MSを行った。

2. 7 アントシアニンのLC/MS

2. 7. 1 試料前処理

表1に示す各種漬物のうち3種類(ID 14-16)の試料をアントシアニンのLC/MSに供した。試料

20gに蒸留水60mLを加え、5分間10,000rpmでホモジナイズした後、4,500rpmで5分間遠心分離を行い、その上清を取った。さらに残渣に蒸留水10mLを加え、同様に遠心分離を行い、この上清を先の上清と合わせた後、蒸留水で100mLになるようにメスアップした。この溶液を1mLずつエッペンチューブに分注し、遠心エバポレーターを用いて、2倍に濃縮した後、メンブランフィルター(ADVANTEC製 DISMIC13HP)でろ過し、アントシアニンLC/MS試験液とした。

2. 7. 2 アントシアニンのLC/MS

アントシアニンLC/MS試験液固相抽出液について、アントシアニンをターゲットとしたLC/MSを行った。装置は2. 3と同様である。分析条件はカラムにインタクト(株)製CadenzaCD-C18 150mm \times 2mm(3 μ m)を用い、流速0.2mL/min、温度40°Cで移動相は(A)0.1%ギ酸水溶液、(B)0.1%ギ酸添加アセトニトリルを表4に示すグラジエントで行った。イオン源はESIを用い、ポジティブモードで行った。

表4 アントシアニン分析条件

時間(分)	0	60	61	70
B(%)	6	30	50	50

3 結果及び考察

3. 1 オリゴ糖のLC/MSの結果及び考察

今回分析したすべての漬物からm/z=563.182のマススペクトル、すなわち三糖(C₁₈H₃₂O₁₆)の酢酸イオン(CH₃COO⁻)付加イオンが検出された(図1)。三糖の一種であるラフィノースは広く植物に含まれているが、漬物の原料である野菜由来の三糖が検出されたものと考えられる。

また醤油、味噌などの大豆を原料に含む漬物(表1、ID 9~13)及び奈良漬(表1、ID 5~8)から

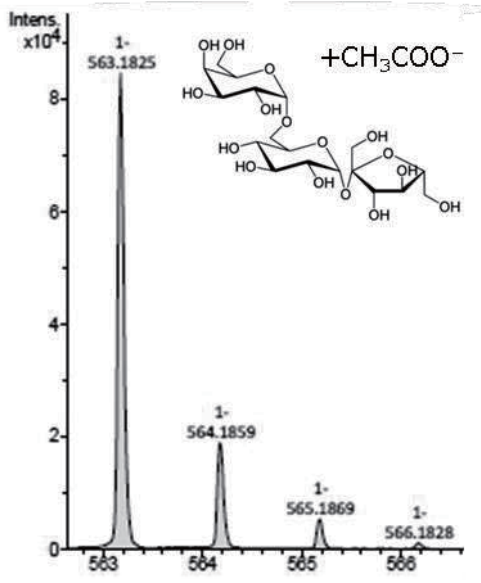


図1 三糖のマスペクトル

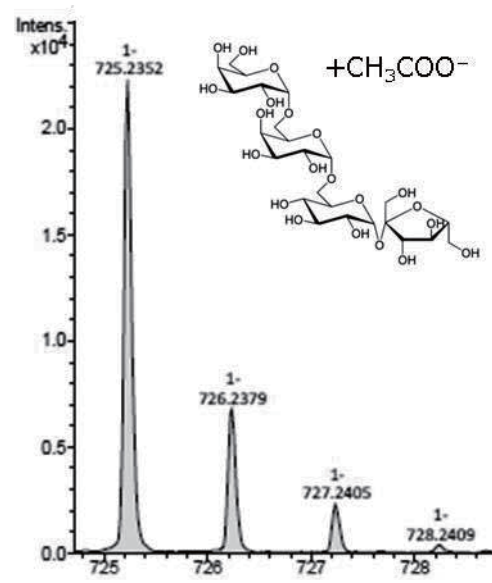


図2 四糖のマスペクトル

m/z=725.236 のマスペクトル、すなわち四糖 (C₂₄H₄₂O₂₁) の酢酸イオン (CH₃COO⁻) 付加イオンが検出された (図2)。四糖の一種であるスタキオースは大豆に含まれているが、漬物にもスタキオース等の四糖が残っているものと考えられる。

これらオリゴ糖は大腸まで届いてビフィズス菌を増殖させる作用があると言われており、漬物を食することで整腸作用を期待できることが示唆された。

3. 2 ACE 阻害活性及びペプチドの LC/MS の結果及び考察

LC/MS 試験液及び2種類のラベル化 LC/MS 試験液から検出されたマスペクトルについてジペプチド及びトリペプチドの可能性を検討したところ、表5に示す14種類の m/z を持つ擬分子イオンについてジペプチドもしくはトリペプチドの可能性が高いことを確認した。

図3～5に示すとおり m/z=187.10 のマスペクトル (C₈H₁₅N₂O₃) はジペプチド (Ala-Pro) のブ

表5 LC/MS で検出されたジペプチド及びトリペプチドに相当するマスペクトル

m/z	組成解析結果(MH ⁺)	構成アミノ酸の組み合わせ候補	検出されたサンプルID
175.108	C ₇ H ₁₅ N ₂ O ₃	Gly-Val	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13
179.048	C ₉ H ₁₇ N ₂ O ₃ S	Gly-Cys	3
187.107	C ₈ H ₁₅ N ₂ O ₃	Ala-Pro	1, 2, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13
189.123	C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₃	Ala-Val, Gly-Leu, Gly-Ile	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
203.101	C ₈ H ₁₅ N ₂ O ₄	Pro-Ser	1, 2, 4, 9, 10, 11, 12, 13
213.123	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₃	Pro-Pro	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
219.132	C ₉ H ₁₉ N ₂ O ₄	Leu-Ser, Ile-Ser, Thr-Val	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
269.161	C ₁₂ H ₂₁ N ₄ O ₃	His-Leu, His-Ile	5, 7, 8, 9, 11
274.139	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₅	Ala-Pro-Ser, Gly-Pro-Thr	6, 9, 10, 11, 12
308.092	C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₆ S	Ala-Asp-Cys, Glu-Gly-Cys	3
319.158	C ₁₂ H ₂₃ N ₄ O ₆	Ala-Gln-Thr, Asn-Ser-Val	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
342.139	C ₁₃ H ₂₀ N ₅ O ₆	Ala-Asp-His, Glu-Gly-His	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
347.191	C ₁₄ H ₂₇ N ₄ O ₆	Asn-Leu-Thr, Asn-Ile-Thr, Gln-Leu-Ser, Gln-Ile-Ser, Gln-Val-Thr, Glu-Lys-Ser, Lys-Asp-Thr	5, 6, 7, 8, 9, 11
424.182	C ₁₈ H ₂₆ N ₅ O ₇	Asn-Gln-Tyr	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

ロトン付加イオンに相当するが、ダブルシルクロリドラベル化及び PITC ラベル化を施した場合には、それぞれラベル化により付加する部位の質量だけ増加した m/z を持つマススペクトル及びラベル化部位の極大吸収波長を確認した。他のペプチドの可能性の高いマススペクトルについても同様に確認を行った。

血圧降下作用の指標である ACE 阻害活性については、アミノ基末端側に疎水性アミノ酸（イソロイシン、ロイシン、バリン、トリプトファン、プロリン）、カルボキシル基末端側に芳香族アミノ酸（チロシン、フェニルアラニン）あるいはプロリンであるジペプチドの活性が高いという報告がある^{1), 2), 3)}。今回検出されたマススペクトルに相当するペプチドについてもこれらのアミノ酸を含むペプチドがあることから、漬物に含まれるペプチドにも血圧降下作用等の機能が期待できることが示唆された。

また、ACE 阻害活性の分析結果と LC/MS で検出されたジペプチド、トリペプチドに相当するマススペクトルの数を比較したところ、表6のように、後者が多くなるほど ACE 阻害活性測定では IC50（50%阻害濃度）が低くなり、高い血圧降下作用を持つ傾向を示した。すなわち、この結果から漬物に含まれるペプチドにも血圧降下作用等の機能が期待できることが示唆された。

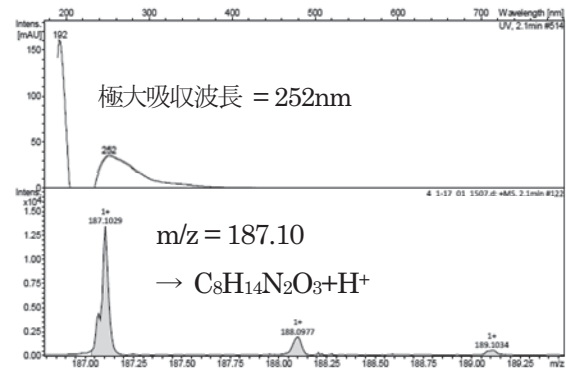


図3 ジペプチド(Ala-Pro)の UV スペクトルとマススペクトル

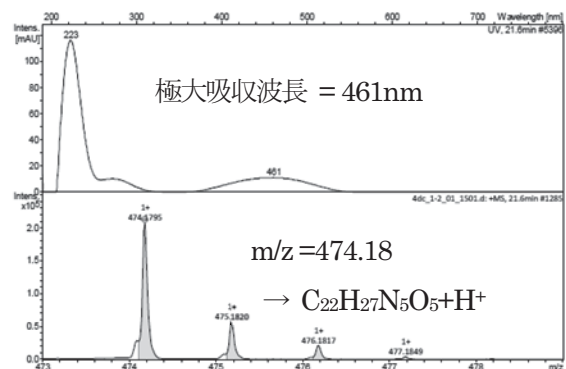


図4 ダブルシルクロリドラベル化ジペプチド (Ala-Pro)の UV スペクトルとマススペクトル

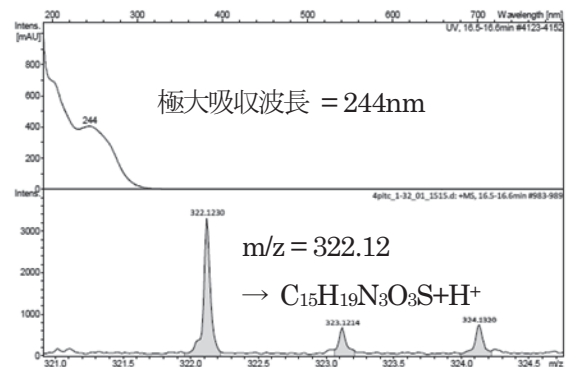


図5 PITC ラベル化ジペプチド(Ala-Pro)の UV スペクトルとマススペクトル

表6 ACE 阻害活及び LC/MS の結果

ID	種類	ジペプチド、トリペプチドに相当するマススペクトルの数	IC50 (μg/mL)
9	祇園漬(うり)	12	290
5	奈良漬(うり)	10	550
6	奈良漬(きゅうり)	9	440
7	奈良漬(守口大根)	9	650
8	奈良漬(すいか)	9	650
12	たまり賀茂茄子	6	470
3	千枚漬	4	15,000

3.3 ORAC 分析及びアントシアニンの LC/MS の結果と考察

ORAC 分析の結果は表7に示すとおりであり、この中ではしば漬け（茄子）で高い ORAC 値を示し、抗酸化能が期待できることが示唆された。その一方で、しば漬け（胡瓜）及びしば漬け（茄子・胡瓜（中国産））ではそれほど高い ORAC 値は示さなかった。

3種類のしば漬けについて、アントシアニンを対象に LC/MS を行ったところ、しば漬け（茄子）では茄子由来のアントシアニンであるナスニン、及び、紫蘇由来のアントシアニンであるシソニンとマロニルシソニンが検出され、これらの成分がしば漬け（茄子）の高い ORAC 値に寄与していることが示唆された。3種類のしば漬けの LC/MS において、ナスニン、シソニン、マロニルシソニンに相当する抽出イオンクロマトグラム（EIC）のピーク面積は表8に示すとおりである。

このピーク面積はそれぞれの成分の含有量に比例するが、最も高い ORAC 値を示したしば漬け（茄子）でいずれのピーク面積も最も大きい値を示した。しば漬け（茄子）と比較して、しば漬け（胡瓜）でナスニンのピーク面積が200分の1程度であり、シソニンのピーク面積が3分の2程度、マロニルシソニンのピーク面積が2分の1程度であった。これらの結果からしば漬け（茄子）の高い ORAC 値には茄子由来のアントシアニンであるナスニンがより大きく寄与していることが示唆される。

最も低い ORAC 値を示したしば漬け（茄子・胡

瓜（中国産））ではこれらのピークが検出されなかった。

表7 ORAC 値の分析結果

ID	種類	ORAC値 (μ mol TE/100g)
1	すぐき(葉)	1,500
2	すぐき(根)	1,400
3	千枚漬	850
4	千枚漬(一週間長漬)	780
5	奈良漬(うり)	2,200
6	奈良漬(きゅうり)	2,100
7	奈良漬(守口大根)	2,100
8	奈良漬(すいか)	2,100
9	祇園漬(うり)	2,700
10	祇園漬(きゅうり)	2,400
11	祇園漬(かぶら)	2,800
12	たまり賀茂茄子	1,100
13	キムチごぼう	1,900
14	しば漬け(茄子)	4,400
15	しば漬け(胡瓜)	840
16	しば漬け (茄子・胡瓜(中国産))	290

4 まとめ

オリゴ糖については、分析したすべての漬物から三糖が検出され、原料に大豆を含む漬物から四糖が検出された。これらオリゴ糖は大腸まで届いてビフィズス菌を増殖させる作用があると言われており、漬物を食することで整腸作用を期待できることが示唆された。

検出されたジペプチド、トリペプチドの種類が多い漬物ほど ACE 阻害活性は高い傾向を示した。この結果から漬物に含まれるペプチドは血圧降下作用を示す可能性が示唆された。

高い ORAC 値を示した茄子のしば漬けでは茄子由来のナスニン及び紫蘇由来のシソニン、マロニルシソニンといったアントシアニンが抗酸化能

表8 しば漬けのアントシアニン含有相対値と ORAC 値の比較

ID	種類	ピーク面積			ORAC値 (μ mol TE/100g)
		ナスニン	シソニン	マロニルシソニン	
14	しば漬け(茄子)	4,434,415	752,519	695,006	4,400
15	しば漬け(胡瓜)	20,038	514,604	375,216	840
16	しば漬け(胡瓜・茄子(中国産))	検出されず	検出されず	検出されず	290

に寄与していることが考えられるが、とくにナスニンが大きく寄与していることが示唆された。

5 参考文献

- 1) H. S. Cheung, F. L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo, and D. W. Cushman: J. Biol. Chem., vol. 255, p. 401 (1980)
- 2) 川上晃・茅原紘: 栄食誌, vol. 46, p. 425 (1993)
- 3) 末綱邦男: Journal of National Fisheries University, vol. 50, p. 61 (2002)