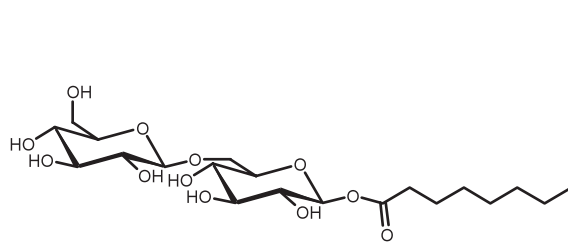


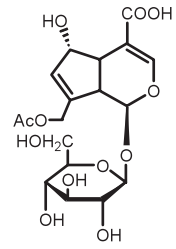
ノニジュース熟成過程での活性物質 (NB10、NB11) の濃度の変化

市場俊雄

ノニジュースの熟成過程における NB10 と NB11 の濃度変化や、熟成や保存条件の違いによる濃度の差を LC/MS で定量分析した。その結果、NB10 はフレッシュな果実には数百 ppm オーダーで存在するが、熟成や熱処理により急激に減少することがわかった。特に熟成初期の段階 (3 週間程度) でフレッシュな果実の濃度の 100 分の 1 程度まで減少した。一方、NB11 も熟成により減少するがその程度は穏やかで、また加工法や保存法による濃度差も小さいことが分かった。



NB10 の構造



NB11 の構造

1 はじめに

ノニは民間伝承的に様々な機能性を持つといわれており、ポリネシアを中心に飲用、外用薬、化粧品など、多くの用途に利用されてきた¹⁾。現在では熟成ノニジュースが健康食品市場で大きな市場を占めている。しかし、沖縄県内のメーカーをはじめとしてほとんどが自然熟成で加工を行っており、その熟成管理手法が確立していないのが現状である。

我々は、ノニジュースの熟成管理指標の一つとしてノニの果汁から単離同定された成分の NB10 と NB11 に注目した^{2), 3)}。ノニジュース中の NB10 と NB11 は JNK 阻害活性を持つことが示唆されているが、本研究に先立って、これら 2 成分が沖縄産ノニ果実から製造されたジュース中にも含まれることを、H17 年度沖縄産学官共同研究推進事業の一環として確認している⁴⁾。そこで、熟成過程におけるこれら 2 成分の濃度変化や、各種条件の違いによる濃度の差を LC/MS による定量を行うことで確認した。その結果、NB10 はフレッシュな果実には数百 ppm オーダーで存在するが、熟成や熱処理により急激に減少することがわかった。特に熟成初期の段階 (3 週間程度) でフレッシュな果実の濃度の 100 分の 1 程度まで減少することが分かった。一方、NB11 も熟成により減少するがその度合いは穏やかで、また加工法や保存法による濃度差も大きくないことが明らかになったので報告する。

2 実験材料および方法

2-1 試薬および機器

HPLC 分析用移動相には、超純水 (電気伝導度 $0.06 \mu\text{s}$

以下の蒸留/脱イオン水)、高速液体クロマトグラフ用メタノール (和光純薬)、高速液体クロマトグラフ用酢酸 (和光純薬)、および 10M 酢酸アンモニウム溶液 (和光純薬) を使用した

HPLC 分析装置は、送液システム (ウォーターズ アライアンス 2695)、MS 検出器 (マイクロマス Quattro micro API) を用いて行った。

分析用カラムには YMC-Pack Pro C18 (ワイエムシイ $3 \mu\text{m}$ $4.6\text{mmID} \times 100\text{mmL}$) を使用した。

NB10 および NB11 標準試料溶液は、ノニジュースから単離・同定した自家標品をそれぞれ $500 \mu\text{g/mL}$ の濃度で 50%DMSO (特級、和光純薬) に溶解したものをもとに、50%DMSO で 5 倍ずつ順に希釈し、 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $20 \mu\text{g/mL}$ 、 $4 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.8 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.16 \mu\text{g/mL}$ を調製した。この標準溶液 $5 \mu\text{L}$ を注入し、SIR クロマトグラムで得られたピーク面積より検量線を作成した。

• NB10 の検量線: ESI+ SIR $m/z486$ $y = 3424.7x + 110.88$ ($R^2 = 0.9992$)

• NB11 の検量線: ESI- SIR $m/z486$ $y = 506.1x + 19513$ ($R^2 = 0.9865$)

定量限界 (S/N=10) は NB10 と NB11 でそれぞれ $0.1 \mu\text{g/mL}$ と $2 \mu\text{g/mL}$ 以下、検出限界 (S/N=2) は NB10 と NB11 でそれぞれ $0.01 \mu\text{g/mL}$ と $20 \mu\text{g/mL}$ 以下であった。

ノニジュースは海邦商事から提供されたものをメタノールで 2 倍に希釈し、2500rpm で 15 分間遠心分離した上清を $0.2 \mu\text{m}$ のシリンジフィルター (ワイエムシイ Duo-Filter) でろ過したものをを用いた。

2-2 分析対象となるノンジュース

仕込み時期と仕込み方法の違う3種類のジュース（ジュース①：大樽9月14日仕込み；ジュース②：大樽10月12日仕込み；ジュース③：小分け12月7日仕込み）を用いた。またジュース③では小分けした3袋からそれぞれサンプリングした（③ロットA、③ロットB、③ロットC）。

2-3 分析条件

NB10のHPLC分析では移動相にメタノール/水/400mM酢酸アンモニウムを使用し（図1）、カラム温度は25℃、流速は1.0mL/min、スプリット比は約1:2で（MS側350μL/min、廃液側650μL/min）、注入量は25μL、イオンソースはESIを用いイオンソース温度は350℃、デソルベーション温度は100℃、キャピラリー電圧は3.2kV、コーン電圧は30V（ポジティブSIR m/z 486.2）、ドゥウェル時間350μsecに設定した。

NB11のHPLC分析では移動相にメタノール/水/2%ギ酸を使用し（図2）、カラム温度は25℃、流速は1.0mL/min、スプリット比は約1:2で（MS側350μL/min、廃液側650μL/min）、注入量は5μL、イオンソースはESIを用いイオンソース温度は350℃、デソルベーション温度は100℃、キャピラリー電圧は3.2kV、コーン電圧は40V（ネガティブSIR m/z 431.1）、ドゥウェル時間350μsecに設定した。

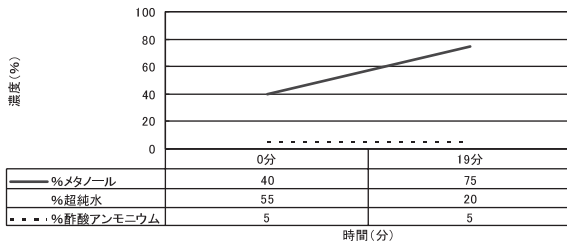


図1 NB10 定量分析のグラジエント条件

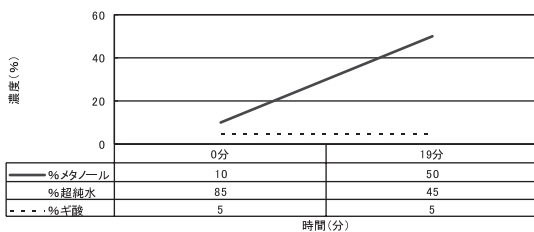


図2 NB11 定量分析のグラジエント条件

3 結果と考察

3-1 熟成過程における経時変化

NB10はノンジュースに特有の有用成分であり、またノンジュースに特徴的な高濃度成分であるNB11を指標

として、高品質なノンジュースの製造工程を確立することができれば、これまで科学的な根拠に乏しかったノンジュースを付加価値の高い健康志向製品として製造販売できる。さらに特定の有用成分を基準として製品の品質評価が可能になれば、これまでヒトの経験に頼っていた熟成工程の管理や、製品の品質管理に分析的な手法が導入できより高品質な製品製造につながるものと思われる。そこで今回、熟成過程におけるNB10とNB11の濃度を測定し、これら2成分が工程管理、製品の品質管理に利用できる可能性があるかどうかを確認した。

その結果、NB10は経時的に減少することが分かった。特に、熟成開始から3週間ほどで急激に濃度は下がり、6週間目あたりでほぼ横ばいとなった（図3、4）。当初数百ppmオーダーで存在するが、2ヶ月後にはその10分の1程度の数ppmオーダーまで減少することが分かり、最終的な製品になる12週間後には更に減少していることが予測される。これは熟成過程において酵素的または微生物等によりNB10が分解または変換されていくことを示している。

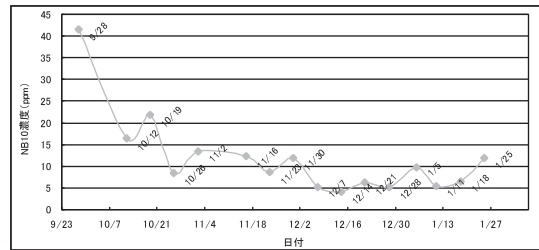


図3 ジュース①中のNB10の経時変化

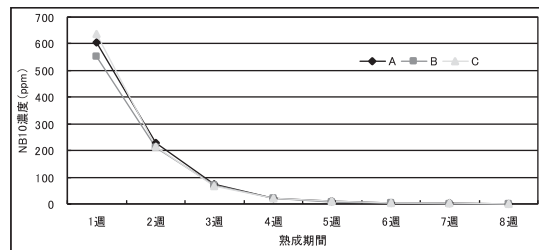


図4 ジュース③中のNB10の経時変化

一方NB11も、熟成によりその濃度は減少するがその減り方はNB10ほど特徴的ではなく、熟成期間にほぼ比例して直線的に減少していくことが分かった（図5、6）。NB10は通常熟成終了とされる熟成開始から2-3ヶ月でほぼ定常状態になることから熟成度合いの目安にはできないが、製品中のNB10の濃度を品質基準の一つとして利用することは可能で、今後NB10の濃度レベルなどを規定するための詳細な実験が望まれる。一方、NB11は

熟成期間に応じてほぼ直線的に濃度が減少することから、NB11 濃度を熟成度合いの目安にできる可能性がある。NB11 濃度はNB10濃度同様品質基準の一つとしても利用可能なことから、NB10 同様今後更に詳細な実験を行うことが望まれる。

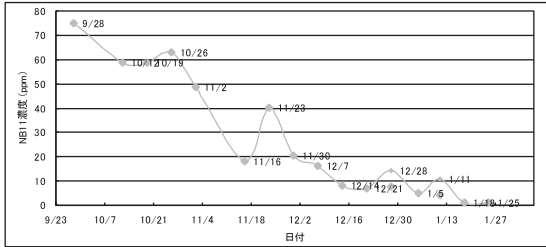


図5 ジュース①中のNB11の経時変化

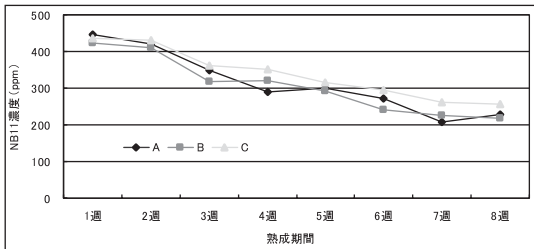


図6 ジュース③中のNB11の経時変化

3-2 市販品中の含有量の比較

市販のノンジュースは、原料の入手先や熟成・加工法などがメーカーにより異なると考えられ、それぞれの製品は製造したメーカーの特徴があるものと思われる。今回は海邦商事が収集した4種類の市販ノンジュース中のNB10とNB11を定量し、この2成分で異なるメーカー間のノンジュースを特徴付けることができるかどうかを検討した。

その結果、NB10はメーカーにより2~4倍の濃度差があることが分かった(図7)。一方、NB11は3社(図8中のA、C、D)の製品で非常に近い値を示し、1社(図8中のB)のものが他3社のものに比べて極端に低い値となった。NB10は熟成により濃度が大きく変化するが、その濃度は約1ヶ月ではほぼ横ばいとなり(図3、4)、通常どのメーカーも3ヶ月程度熟成した果汁を製品としていることから、NB10濃度はメーカーによる差が出にくいものと考えられる。またNB11は熟成による濃度変化が小さいことから、同じ程度の熟成期間で製造されたジュースは、メーカー間の差が出にくいと考えられる。

メーカーによりノンジュースの搾汁法が異なることがこれまでの海邦商事の調査で分かっている。海邦商事は、熟成後の果実をそのまま圧搾して得られた搾汁(いわゆる

“1番絞り搾汁”)をそのままジュースとして製品化しているが、メーカーによっては圧搾汁に水を加えて搾汁したいわゆる“2番絞り搾汁”を1番絞り搾汁に加えて製品化していたり、ビン詰めの際に水を添加し製品の質を調整したりすることが分かっている。そのため今回分析したジュースのNB10とNB11の濃度差はこのような製造方法の違いによるジュースの濃度差を反映している可能性もあると思われる。

興味深いことにNB11の濃度とNB10の濃度には相関が見られない。これに関しては分析の検体数が少ないこともあり考察することは困難であり、今後検体数を増やして検討する必要があると思われる。

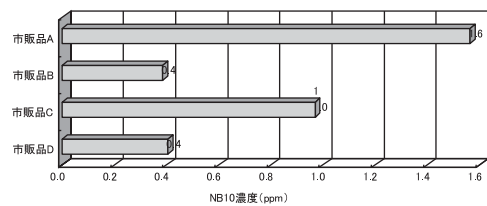


図7 市販ジュース中のNB10濃度

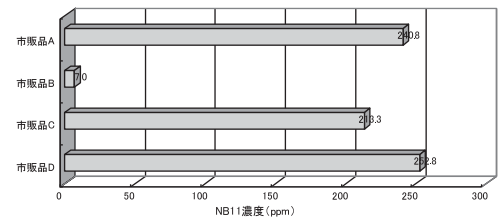


図8 市販ジュース中のNB11濃度

3-3 収穫後の保存法の違う果実から得られたエキス中の濃度の比較

通常ノンジュースの製造では、果実収穫後直ちに樽へ仕込み3ヶ月程度熟成させる。しかし果樹園と工場の間には距離がある場合も多く、果樹園でそのまま樽への仕込ができない限り、工場までの移動距離により仕込み時の原料の品質にばらつきが生じる可能性がある。そこで今回、仕込みまでの保存法が製品の品質にどの程度影響するか調べる目的で、収穫後冷凍しそのまま2週間冷凍保存した果実と、収穫後冷蔵しそのまま2週間冷蔵保存した果実をそれぞれ50%エタノールで抽出し、その抽出物中のNB10とNB11濃度を測定した。

その結果、NB10、NB11共に冷凍保存したものは冷蔵保存したものに比べ2倍近い濃度であることが分かった(図9、10)。これは冷蔵環境下でもノニの熟成に関する酵素が十分活性を持つことを示唆しており、収穫から仕込みまでの原料の管理を厳格に行わなければ、仕込み時

の原料の品質に大きなばらつきが出る可能性のあることを示している。今後原料の仕入れにあたり、果樹園から工場までの輸送手段などを十分に考慮した上で仕入計画などを立てる必要があると思われる。

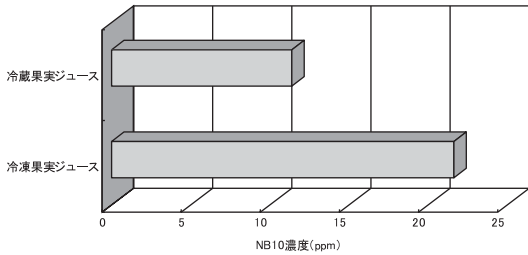


図9 保存方法の違う果実中のNB10

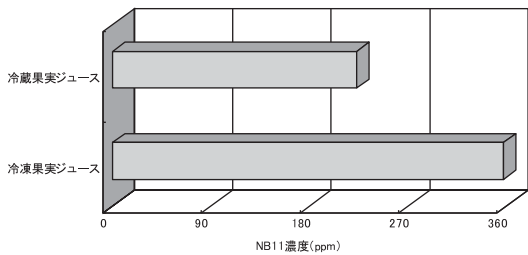


図10 保存方法の違う果実中のNB11

3-4 加熱処理ジュースと非加熱ジュース中の濃度の比較

ノニジュースは搾汁後製品としてビン詰めされるが、ビン詰め後も熟成が進んでいる可能性がある。熟成が製品化後進行すれば、店頭での販売方法や倉庫での保存状態により製品の品質が大きく異なる可能性がある。この問題は、製品化の際の滅菌処理条件である90℃(3分)で熱処理をすることで酵素も失活し、熟成の進行も同時に抑えることができていると思われる。しかしこの熱処理により成分も分解等の変化を起している可能性があることから、これを確認するため今回4週間熟成したジュースを用いこれを90℃で3分間処理したものと未処理のものの中のNB10とNB11を定量した。

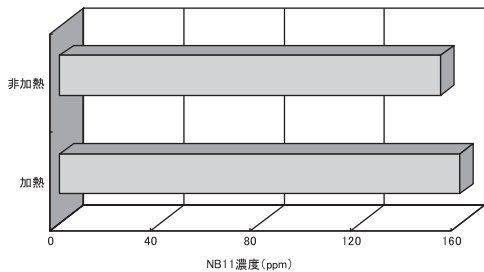


図11 熱処理方法の違うジュース中のNB11

その結果、NB11は変化が無いことが分かった(図11)。一方NB10は、8倍近い濃度差があることが分かった(図

12)。今後、時間依存的にNB10濃度が減少するかどうかを確認するなどさらに詳しい実験を行う必要があるが、NB10は熱によって分解する可能性がある。

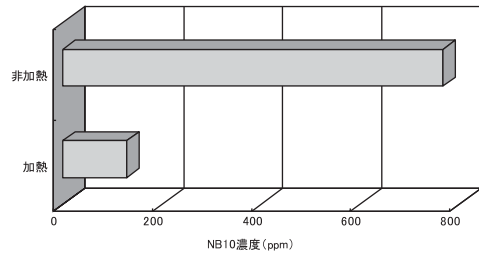


図12 熱処理方法の違うジュース中のNB10

3-5 冷凍保存したジュースと冷蔵保存したジュース中の濃度の比較

これも熱処理同様に、ビン詰め後の製品の品質を確認するための実験である。この実験では、ビン詰めしたロットの違う2種類のジュース(ロット①:6週間熟成;ロット②:4週間熟成)を1週間冷蔵保存した場合と冷凍保存した場合の、ジュースの品質をNB10とNB11を定量することで比較検討した。

その結果、NB11の濃度は保存方法が違ってもほとんど差が無いことがわかった(図13)。一方、NB10はロット①では3倍近い差があり、ロット②では冷蔵保存ジュースも冷凍保存ジュースも0.5ppmで同じであった(図14)。

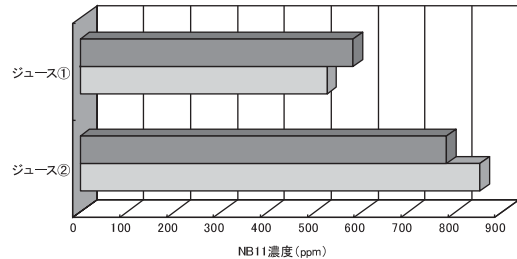


図13 保存方法の違うジュース中のNB11

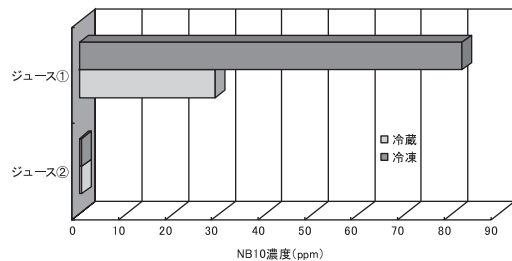


図14 保存方法の違うジュース中のNB10

3-6 3回の仕込みの違うジュース中の濃度の比較

ロットの違う製品の品質を確認するための実験で、仕

込み時期と仕込み方法の違う3種類のジュース（ジュース①：大樽9月14日仕込み；ジュース②：大樽10月12日仕込み；ジュース③：小分け12月7日仕込み）間のNB10とNB11を定量することで、仕込がジュースの品質に与える影響を成分で比較検討した。またジュース③では小分けした3袋からサンプリングし（③ロットA、③ロットB、③ロットC）ロット間の成分差も検討した。

その結果、ロット間（③A、B、C）ではNB10とNB11の濃度差は非常に小さく再現性は良かった（図15、16）。一方、仕込み間（①、②、③）ではNB11はジュース②と③ではほとんど差が無いが、ジュース①では②、③に比べ9分の1程度の低濃度であった。NB10は熟成初期では仕込み間の差は非常に大きいですが、NB10の特徴として熟成が進むにつれ低濃度で安定してくることから、仕込み間の差も小さく（目立たなく）なる。

この実験度で、熟成による変化率の小さいNB11は、仕込んだときの原料の品質に製品の品質が大きく左右される可能性があるが、熟成初期で濃度が急激に低くなり、製品化に適する2ヶ月以上の熟成期間をおいたジュース中の濃度が比較的（低くても）安定しているNB10では、製品中の濃度差は小さいことが示唆された。

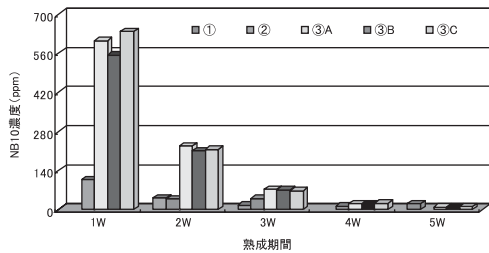


図15 仕込みの違うジュース中のNB10

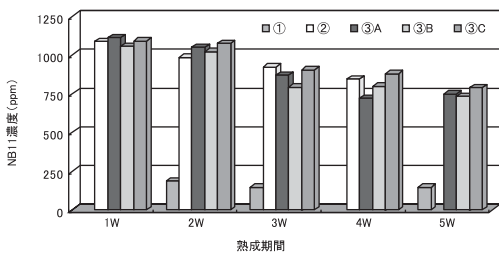


図16 仕込みの違うジュース中のNB11

3-7 滲出液と圧搾ジュース中の濃度の比較

滲出液は熟成の過程で果実から滲み出てくる液体のことで、通常熟成3-4週目頃から顕著になってくる。一方、圧搾ジュースは一般的な製造方法で製造されるいわゆる“ノンジュース”のことで、手または機械で熟成した果実を強制的に搾り出てきた液体のことである。今回、熟

成過程を研究するに当たり、両液を別々に得ることができるとそれぞれの特徴を生かした製品開発の可能性を検証するために、違いの目安としてそれぞれの液中のNB10とNB11を定量した。

その結果、NB10は分析を行った11週目から15週目までの試料中で数ppmレベルの低濃度で既に定常状態に入っており、これは圧搾ジュースと滲出液で同程度であった（図17）。一方NB11は、この熟成期間でも圧搾ジュース、滲出液共に徐々に濃度が下がっておりその傾向は一致していた（図18）。

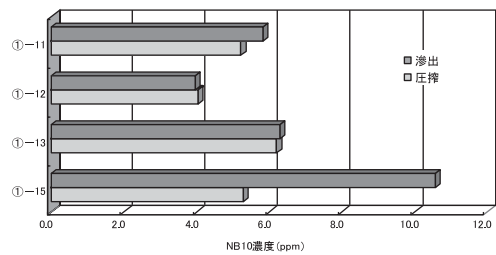


図17 滲出液と圧搾ジュース中のNB10

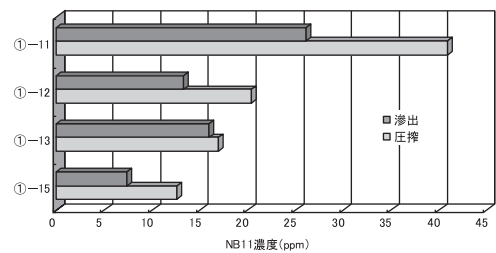


図18 滲出液と圧搾ジュース中のNB11

基本的にはこの2つの液中のNB10とNB11の濃度に大きな違いは無いことが分かったが、NB10濃度は滲出液でわずかに高く、NB11濃度は圧搾ジュースでわずかに高い傾向がある。NB11はNB10に比べて親水性が大きい（逆相クロマトでNB11の方が溶出が早い）ことが、この傾向に影響しているのかもしれない。

なお、図17中の①-15、図18中の①-11で圧搾ジュースと滲出液中のNB10とNB11濃度がかかなり違うがこれは分析誤差の範囲内だと考えられるが、今後追試など検討を加えるほうが望ましいと思われる。

4 まとめ

今回各種試料中のNB10とNB11を定量したが、それぞれの試料で検体が1つしかなく分析結果の再現性を評価することができなかった。そのため今回の分析結果は、あくまで傾向を見るための参考値として捕らえるべきであると考えられる。図3~6に示される熟成過程での濃度

変化のように、個々の定量値では多少グラフが上下に振れているが、対象期間を通すと明らかに減少傾向が見られるような実験では、比較的信頼性は高いと思われるが、仕込み間の各成分の濃度差や異なる保存方法間の各成分の濃度差を見るような実験では、必要に応じて繰り返しなどさらに分析を重ねる必要があると思われる。

今回は、NB10 と NB11 についてのみの分析比較実験であったが、図らずも化学的性質の大きく異なる 2 成分を指標にしたことで、各比較において特徴のある結果を得ることができた。今後製品の品質とこれらの成分との関連を検討し、品質管理に活用できる可能性を確認する必要がある。さらに、今回分析した 2 成分以外で、品質や機能と相関の高い成分がある可能性もありこれに関する研究も今後検討したい。

謝辞

この研究は、平成 17 年度沖縄産学官共同研究推進事業として当該研究を財団法人亜熱帯総合研究所の委託により実施致しました。プロジェクトリーダー兼事業化推進リーダーの與那嶺安雄様（株式会社海邦商事）、共同研究者の入福濱寿様（株式会社海邦商事）、荻谷研一教授（琉球大学大学院医学研究科）、また事務局としてお世話いただきました仲盛広明様（亜熱帯総合研究所）、山本成様（亜熱帯総合研究所）にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Mian-Ying Wang *et al.* *Acta Pharmacologica Sinica* **2002**, 23, 1127-1141, Johannes Seidemann *Pharmazeutische Zeitung* **2001**, 146, 36-40.
- 2) Mingfu Wang *et al.* *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1182-1183.
- 3) Mingfu Wang *et al.* *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, 47, 4880-4882.
- 4) 市場俊雄 沖縄産ノニジュースに含まれる生理活性物質の単離と同定 沖縄県工業技術センター研究報告第 8 号、1-4 (2006)

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

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.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。