

報 文

## 国産および輸入クルミのポリフェノールと *in vitro* 抗酸化能

戸井田英子<sup>1\*</sup>, 田島 眞<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 長野県短期大学生生活科学科

<sup>2</sup> 実践女子大学

### Polyphenolic Composition and Antioxidant Capacity of Japanese and American Walnuts *in vitro*

Eiko Toida<sup>1\*</sup> and Makoto Tajima<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Living Sciences, Nagano Prefectural College, 8-49-7 Miwa, Nagano, Nagano 380-8525

<sup>2</sup> Department of Food and Health Sciences, Faculty of Human Life Sciences,  
Jissen Women's University, 4-1-1 Osakae, Hino, Tokyo 191-8510

The proximate composition (%) of Japanese walnut (*Shinano*) was determined to be as follows : crude protein, 13.6; crude fat, 67.5; carbohydrate, 14.3; ash, 1.7; and moisture, 2.9. 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity was 186.2 and 144.8  $\mu\text{mol}$  of Trolox equivalent per gram dry weight in Japanese and American walnuts, respectively, indicating that Japanese walnuts exhibit slightly stronger antioxidant capacity than American walnuts. The total polyphenol content was 2202.3 and 1855.0 mg of gallic acid equivalent per 100 g dry weight in Japanese and American walnuts, respectively, indicating that Japanese walnuts have a slightly higher polyphenol content than American walnuts. The principal ellagitannin compounds were 445.7 and 473.5 mg of ellagic acid equivalent 100 gram dry weight in Japanese and American walnuts, respectively, indicating that American walnuts have slightly higher ellagitannin content than Japanese walnuts. The results presented above indicate that polyphenolic compounds contribute to the antioxidant capacity. The data also suggest that the antioxidants in walnuts include both identified ellagitannins and unidentified polyphenolic compounds. The study also demonstrates differences in polyphenolic composition between Japanese and American walnuts, which reflect antioxidant capacity. These observations are likely related to differences between the two countries in cultivation region and horticultural practices, as well as genetic factors and post-harvest processing. (Received Jul. 30, 2014; Accepted Oct. 9, 2014)

**Keywords** : *Shinano* walnut, *Juglans regia* L., antioxidant capacity, polyphenolic composition, ellagitannin

**キーワード** : シナノクルミ, ペルシヤグルミ, 抗酸化能, ポリフェノール組成, エラジタンニン

クルミはクルミ科クルミ属とその栽培品種の果実の総称で、食用とされる。南・北アメリカ、ヨーロッパ東南部、アジア東部にかけて広く分布している<sup>1)</sup>。そのうち、生産を目的に栽培され、実利的に重要なものはペルシヤグルミ (*Juglans regia* LINN.) を基本とする品種で、わが国の栽培品種であるシナノグルミ (*J. regia* LINN.) やテウチグルミ (*J. regia* LINN var. *orientis* KITAMURA) の基本種でもある<sup>2)</sup>。日本で栽培されているクルミの収穫量は 194.6 t で長野県が 154 t (79.1%) で、青森県 38 t (19.5%)、山形県 2 t (1.0%) である<sup>1)</sup>。日本で市販されているクルミの大半は輸入品である<sup>3)</sup>。輸入量はアメリカが 97.0% と最多で、中国 2.5%、フランスが 0.3% であった (2013 年)<sup>1)</sup>。

クルミ (*J. regia* L.) は栄養価の高い食品で、加熱調理をしなくてもそのまま食べることができる。また、常温貯蔵

性に優れていて、歴史的にみても人類は貴重な食糧としてきた<sup>4)</sup>。

種子 (仁) には脂質が多く、不飽和脂肪酸のリノール酸、リノレン酸、オレイン酸が含まれている。n-3 系脂肪酸に属する  $\alpha$ -リノレン酸は種実類の中では最も多く含まれている<sup>5)6)</sup>。クルミ中の  $\alpha$ -リノレン酸は LDL-コレステロールを低下させる<sup>7)~9)</sup>。近年、心血管疾患<sup>10)</sup>、糖尿病<sup>11)12)</sup>、肥満<sup>13)</sup>を予防し、生活習慣病の改善効果が多く報告されている。Anderson ら<sup>14)</sup> はクルミにはエラグ酸と関連するポリフェノールが含まれ、*in vitro* での LDL 酸化を抑制することを報告し、エラジタンニン類の存在が示唆された。クルミの種皮にはポリフェノールが存在している<sup>15)</sup>、成分は加水分解性タンニンモノマー、ダイマー、複合型タンニン、カテキン、エラグ酸誘導体である<sup>16)17)</sup>。クルミ中の主要なポリ

<sup>1</sup> 〒380-8525 長野県長野市三輪 8-49-7, <sup>2</sup> 〒191-8510 東京都日野市大坂上 4-1-1

\*連絡先 (Corresponding author), toida@nagano-kentan.ac.jp

フェノールは加水分解性タンニン類で、中でもエラジタンニンモノマーが多く、主な化合物はペドウンクラジン、テリマグランジンI、カスアリクチン、テリマグランジンII、ルゴシンC、カスアリニン、エラグ酸等である<sup>18)</sup>。

他にも肝保護作用<sup>19)</sup>や高脂血症改善作用<sup>20)</sup>、糖尿病予防作用<sup>21)</sup>が報告されている。

クルミの栄養成分は五訂増補日本食品標準成分表<sup>22)</sup>に米国産ペルシャクルミの成分値が記載されている。国産クルミの一般成分値はテウチグルミについて古内<sup>23)</sup>が一部を明らかにした。本研究で国産クルミのシナノクルミについて、一般成分値を明らかにする。

シナノクルミは適度な甘みがあり、1果平均重量が14g程度と大きく、果仁歩合が約50%と高い<sup>24)</sup>。その品質は世界の栽培品種の中でも優れている。国内では国産産物を嗜好する消費者が多く、地産地消を推進し、地域の特産品を育むことは食育の観点からも重要である。

クルミの生理作用に関する研究は多くが外国で進められている。国産クルミを用いた研究は食品加工<sup>25)</sup>、育種<sup>26)~28)</sup>に関する報告があるものの、機能性に着目した研究はあまり進んでいない。これまでの研究は外国産のクルミを試料としたデータであり、国内の研究<sup>6)7)16)17)19)~21)</sup>でも国産クルミのデータはない。

以上のことから、本研究はクルミの抗酸化作用に着目し、国産および輸入クルミについて、抗酸化能とポリフェノール含量、組成を明らかにすることを目的とする。

## 実験方法

### 1. 試薬

2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は和光純薬工業製を用いた。フォーリンチオカルトフェノール試薬はMP Biomedicals社より購入した。エラグ酸はSigma-Aldrich社製を用いた。カスアリクチン、テリマグランジンIは長良サイエンス製を購入し、ペドウンクラジン、テリマグランジンII、カスアリニン、ルゴシンCはオリザ油化より入手した。その他の試薬は全て市販の研究用特級試薬を使用した。

### 2. 試料および調製

国産クルミはペルシャクルミ系統のシナノクルミ (*J. regia* L.), 2011年、長野県東御市で収穫されたものを用いた。

輸入クルミはペルシャクルミ (*J. regia* L.), 2011年、米国カリフォルニア州で収穫されたものを用いた。

輸入むきクルミは流通量が多いことから、殻付きの国産および輸入クルミと比較するために用いた。これらはペルシャクルミで、米国カリフォルニア州、購入年は2011年(収穫年は不明)。

国産、輸入クルミは平均重量に近いものから3個体を選択、仁を取り出し、フードミル (TML1000 TESCO社製) で粉碎し、10gを秤量した。

### 3. 一般成分分析の方法

粗タンパク質量はケルダール法により全窒素量を求め、粗脂質はソックスレー抽出法、灰分は550°Cにおける直接灰化法により粗灰分を求めた。水分量は赤外線水分計により求めた。以上の値から、炭水化物は差し引き法(水分、タンパク質、脂質および灰分の合計値(%)を100%から差し引く)により求めた。エネルギー値はタンパク質、脂質、炭水化物の値から算出した<sup>29)</sup>。

### 4. クルミポリフェノールの抽出

上記のように粉碎した試料を10g採取し、ヘキサン50mlで2回繰り返し脱脂処理を行なった後、70%メタノール100mlで抽出を行なった。ホモジナイズ後、遠心分離(12000rpm 15min)を行い、上清液を採取した。この操作を2回繰り返した。回収された上清液は、ロータリーエバポレーターで濃縮し、抗酸化活性、総ポリフェノール量の測定、LC-MS分析、HPLC分析に用いた。

### 5. DPPHラジカル消去能

DPPHラジカル消去能は須田ら<sup>30)</sup>の方法に準じて行った。400μM DPPH, 0.2M MES buffer, 20%エタノールの混合溶液を調製した。試験管に混液2.7mL, 試料, 80%エタノールの濃度を変えて加え、20分間反応させた。520nmにおける吸光度を測定し、クルミ乾燥重量1gあたりのTrolox相当(μmol TE/g-dry weight)としてDPPHラジカル消去能を計算した。

### 6. 総ポリフェノール含量

総ポリフェノール含量はFolin-Denis法<sup>31)</sup>を用いて測定した。すなわち、試料0.2mL, 蒸留水3.2mL, Folin試薬0.2mlを加えて混和3分後に10%炭酸ナトリウム0.4mLを加えた。反応液は攪拌して吸光度760nmを測定した。クルミ重量100gあたりの没食子酸当量としてポリフェノール量を求めた。

### 7. 抗酸化能と総ポリフェノール含量との相関関係

国産、輸入、輸入むきクルミのDPPHラジカル消去能測定値と総ポリフェノール含量との相関係数( $r$ )を求めた。

### 8. クルミのポリフェノール組成の分析

#### (1) LC-MSによる定性分析

抽出液試料2mLはフィルター濾過し、LC-MSに供した。分析条件は次のとおりである。分析にはXevo Q Tof MS (ウォーターズ社)を用いた。カラム; Develosil RPAQUEOUS C30 (φ4.6×250mm, 野村化学製), 温度; 40°C, 溶出液; A液0.1% HCOOH, B液0.1% HCOOH-MeCN, グラジエントの条件, B液0% (20分間), 0→100% (60分間), 100% (20分間), 流速; 0.5mL/minで行なった。MSの条件はイオン化法; ESI, 検出モード; ネガティブで測定した。

**Table 1 Proximate composition of Japanese walnuts**

Component	Content in 100 g-dry walnut weight (%)
Crude protein	13.6
Crude fat	67.5
Crude Ash	1.7
Moisture	2.9
Crude carbohydrate <sup>1)</sup>	14.3

<sup>1)</sup> Crude carbohydrate (% total composition) was calculated by subtracting the other components from the total.

また、標準物質はカスアリクチン、テリマグランジン I、エラグ酸、ペドゥンクラジン、テリマグランジン II、カスアリニン、ルゴシン C とした。

## (2) HPLC による分析

抽出液試料 2 mL はフィルター濾過し、HPLC に供した。HPLC 分析方法は Shimoda ら<sup>20)</sup> の方法を参考にした。

HPLC 分析条件は次のとおりである。分析には 1525HPLC システム (Water 社) を用いた。流速: 1 mL/min, 検出はフォトダイオードアレイ吸収波長: 200–400 nm, カラムは Develosil RPAQUEOUS C30 ( $\phi$  4.6×250 mm, 野村化学製), 温度 40°C, 溶出液: A 液 (10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN, 45 : 45 : 10), B 液 (10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN, 30 : 30 : 40), グラジェントの条件, B 液 0% (10 分間), 0 → 100% (30 分間), 100% (10 分間) で行った。標準物質は LC-MS と同じである。

定量はエラグ酸を標準として各試料のピーク面積との比較から、クルミ 100 g あたりのエラグ酸当量として求めた。7 種類の主要なポリフェノール (エラジタンニン) 含量は合計値で示した。また、未同定ポリフェノール含量は総ポリフェノール含量から主要なポリフェノール含量を差し引いた値として求めた。

## 9. 抗酸化能と同定した主要なエラジタンニン類および未同定ポリフェノールとの相関関係

国産、輸入、輸入むきクルミの DPPH ラジカル消去能と総ポリフェノール含量、エラジタンニン含量、未同定ポリフェノール含量、各種ポリフェノール成分との相関係数 ( $r$ ) を求めた。

## 10. 統計処理

得られた結果は、平均値±標準偏差で表し、クルミ間の有意差検定は、Excel 統計 2008, Tukey-Kramer 法による多重比較を実施した。有意水準は 1% ( $p < 0.01$ ) とした。

## 実験結果および考察

### 1. 一般成分分析結果

国産クルミの一般成分分析結果は Table 1 に示した。五訂増補日本食品標準成分表「くるみ・いり」<sup>22)</sup> と比較すると、灰分、水分は大きな差がなかった。タンパク質は成分表によると可食部 100 g あたり 14.6%, 脂質は 68.8% 含ま

**Table 2 DPPH radical scavenging activity of the walnuts**

Antioxidant capacity ( $\mu$ mol TE/g-dry walnut weight)	
Japanese walnuts	186.2 ± 11.89 <sup>a</sup>
American walnuts	144.8 ± 2.25 <sup>b</sup>
American shelled walnuts	102.7 ± 6.40 <sup>c</sup>

Data expressed as mean ± SD ( $n=4$ ).

Antioxidant capacity expressed as micromoles of Trolox equivalents per gram of dry walnut weight.

\* Values within a column followed by different letters are significant at Tukey's multiple comparison,  $p < 0.01$ .

**Table 3 Total polyphenol content of the walnuts**

Total polyphenol content of the walnuts (mgGAE/100 g-dry walnut weight)	
Japanese walnuts	2202.3 ± 48.24 <sup>a</sup>
American walnuts	1855.0 ± 104.62 <sup>b</sup>
American shelled walnuts	1216.9 ± 107.5 <sup>c</sup>

Data expressed as mean ± SD ( $n=4$ ).

Data expressed as milligrams of gallic acid equivalents per 100 g of dry walnut weight.

\* Values within a column followed by different letters are significant at Tukey's multiple comparison,  $p < 0.01$ .

れているのに対し、国産クルミはそれぞれ 13.6%, 67.5% と低い値を示した。炭水化物は可食部 100 g あたり 11.7% に対し、国産クルミは 14.3% と高い値であった。

## 2. DPPH ラジカル消去能

DPPH ラジカル消去法は信頼性が高い方法である。国産クルミ、輸入クルミ、輸入むきクルミの抗酸化能について、DPPH ラジカル消去法の結果を Table 2 に示した。国産クルミの抗酸化活性 186.2  $\mu$ mol TE/g-dry weight は輸入クルミ 144.8  $\mu$ mol TE/g-dry weight の約 1.3 倍であった。従って、国産クルミは抗酸化能が有意に高いことを示した ( $p < 0.01$ )。

輸入むきクルミの抗酸化活性は 102.7  $\mu$ mol TE/g-dry weight であった。輸入クルミの約 0.7 倍、国産クルミの約 0.6 倍であった。輸入むきクルミは殻付きクルミより抗酸化能が低いことを示した ( $p < 0.01$ )。

## 3. 総ポリフェノール含量

総ポリフェノール含量については Table 3 に示した。国産クルミ 2202.3 mgGAE/100 g-dry weight は輸入クルミ 1855.0 mgGAE/100 g-dry weight の約 1.2 倍であった。国産クルミは輸入クルミよりポリフェノール含量が有意に高いことを示した ( $p < 0.01$ )。これは DPPH ラジカル消去能とも同様の傾向である。総ポリフェノール含量に関して、Kornsteiner<sup>32)</sup> はクルミ 100 g あたり没食子酸当量で 1020 から 2052 mg, Abe ら<sup>33)</sup> は 2499 mg, Wu ら<sup>34)</sup> は 2010 mg と報告している。

輸入むきクルミは 1216.9 mgGAE/100 g-dry weight は

輸入クルミのおよそ0.7倍、国産クルミの0.6倍であった。輸入むきクルミは殻付きクルミよりポリフェノール含量が有意に低いことを示した ( $p < 0.01$ )。

ベルシャクルミ系統である国産、輸入、輸入むきクルミについて、総ポリフェノール量とラジカル消去能との相関係数は  $r=0.986$  で、非常に高い正の相関がみられた。各種クルミ抽出液中の総ポリフェノール含量が高いクルミはラジカル消去能が高い傾向を示した。このことから、抗酸化成分はクルミのポリフェノールであることを示した。

一方、クルミはトコフェロールを含み<sup>32)</sup>、抗酸化能に寄与する<sup>35)</sup>。本実験ではクルミのポリフェノール抽出工程で、脱脂処理を行ったため、脂溶性であるビタミンEの多くは除去されたと考えられる。クルミのビタミンEが抗酸化活性にどのくらい影響するかについては今後の課題である。

#### 4. クルミのポリフェノール組成分析

##### (1) LC-MSによる分析

ペドウンクラジン、エラグ酸、テリマグランジン I、カスアリクチン、テリマグランジン II、ルゴシン C、カスアリンの7成分を標準品として、質量、保持時間との比較から同定した (Table 4)。

##### (2) HPLCによる分析

HPLCによるクルミのポリフェノールの分析結果は Fig.

1に示した。前述した7種類のポリフェノール (エラジタンニン) を標準品として、保持時間、吸収スペクトルとの比較から、各試料抽出液のポリフェノールを同定した。

国産と輸入クルミのクロマトグラムは検出されたピークパターンが似ている (Fig. 1)。各試料ともカスアリクチンのピーク面積が最も高い。それに対して、Shimodaら<sup>20)</sup>は中国産のクルミ種皮を用いた HPLC 分析の結果、ピーク面積はエラグ酸が最も高く、次いでカスアリクチンが高く検出されることを示した。エラグ酸分析の結果は顕著に異な

Table 4 Peak identification and MS data of polyphenols in the walnuts

Peak no.	Retentiontime (min)	MW	m/Z	Compounds
1	33.275	784	783	Pedunculagin
	35.164	784	783	Pedunculagin
2	36.517	786	785	Tellimagrandin I
	37.834	786	785	Tellimagrandin I
3	36.863	936	935	Casuarinin
4	38.684	1104	1103	Rugosin C
5	39.464	936	935	Casuarictin
6	40.157	938	937	Tellimagrandin II
7	43.226	302	301	Ellagic acid

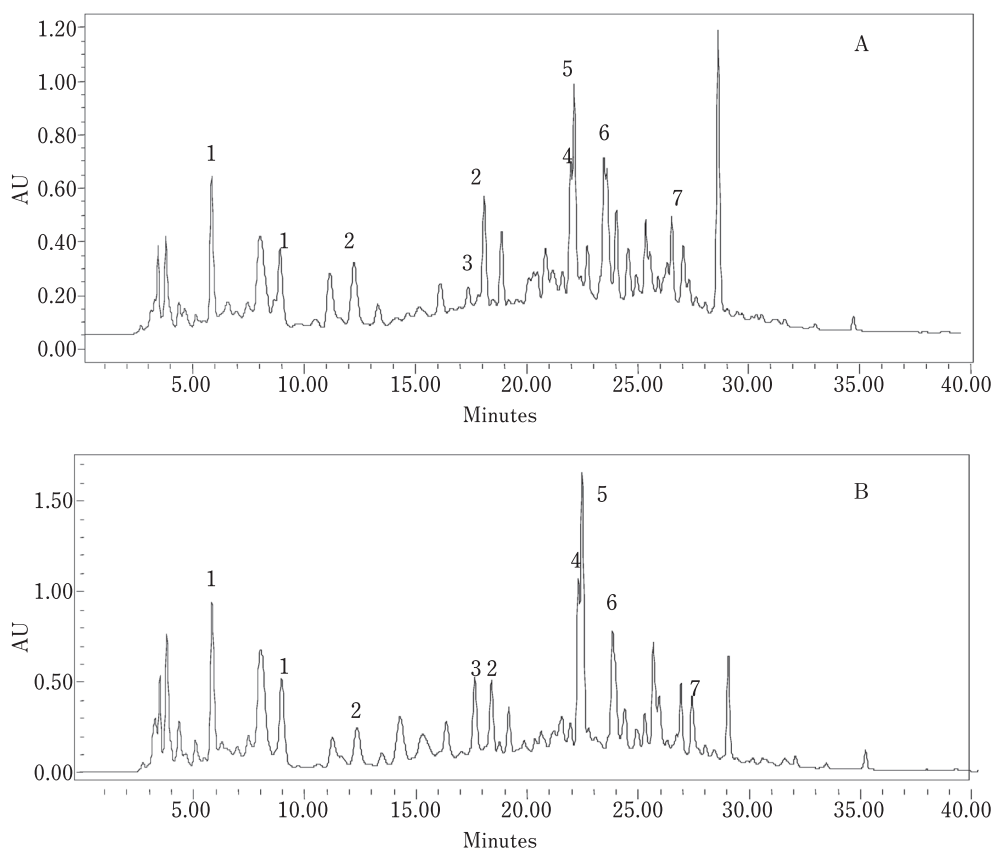


Fig. 1 HPLC chromatograms (280 nm) of walnuts Japanese walnuts A, American walnuts B

Peak : 1, pedunculagin ; 2, tellimagrandin I ; 3, casuarinin ; 4, rugosinC ; 5, casuarictin ; 6, tellimagrandin II ; 7, ellagic acid

**Table 5 Polyphenol contents and relation between the principal polyphenolic compounds (ellagitannins) content (EAEmg/100 g-dry weight) and antioxidant activity ( $\mu\text{mol/g-dry weight}$ )**

Sample	Pedunculagin	Tellimagrandin I	Casuarinin	Rugosin C	Casuarictin	Tellimagrandin II	Ellagic acid	The principal polyphenolic compounds (ellagitannins)	Unidentified compounds
Japanese walnuts	94.4	101.6	29.0	43.7	77.3	62.3	37.4	445.7	1756.6
American walnuts	107.8	73.5	45.3	44.2	86.7	77.9	38.1	473.5	1381.5
American shelled walnuts	67.8	58.8	19.5	24.4	36.7	53.1	21.3	281.6	935.3
Correlation with antioxidant capacity								0.796	0.999

Each the principal polyphenolic compounds (ellagitannins) content expressed as milligrams of Ellagic acid equivalents per 100 g of dry walnut weight

The principal polyphenolic compounds (ellagitannins) are the sum of pedunculagin, tellimagrandin I, casuarinin, rugosin C, casuarictin, tellimagrandin II, ellagic acid by HPLC

Unidentified compounds was estimated by (total polyphenol - the principal polyphenolic compounds)

Correlation with antioxidant capacity and each factor was shown as a coefficient  $r$ .

り、他の成分については今回の結果と似た傾向である。エラグ酸は仁よりも種皮中に多く含まれている<sup>36)</sup>ためと考えられる。HPLC分析の結果からポリフェノールの定量は主要な7種類のエラジタンニン類をエラグ酸当量により求めた (Table 5)。エラジタンニン含量の合計値は国産クルミ 445.7 mg EAE/100 g-dry weight, 輸入クルミ 473.5 mg E-AE/100 g-dry weight であり、輸入クルミが国産クルミを僅かに上回った。輸入むきクルミは 281.6 mg EAE/100 g-dry weight であった。むきクルミは殻付きクルミより主なエラジタンニン含量が低い傾向があり、殻付きクルミのおよそ 60% 程度を含んでいる。

各試料に関して、主要なエラジタンニン含量の合計値と抗酸化能との相関係数は高い値 ( $r=0.796$ ) であることから、クルミの抗酸化成分は今回同定した主要なエラジタンニン類であることを示した。また、未同定ポリフェノール含量を算出したところ、国産クルミの方が高かった。これらの値と抗酸化能との相関係数を求めたところ、3点のみのデータではあるが非常に高い値 ( $r=0.999$ ) であることから、抗酸化能には未同定ポリフェノールも寄与すると推定している。DPPH ラジカル消去能および総ポリフェノール含量は国産クルミが高かった。しかし、今回同定したエラジタンニン含量はむしろ輸入クルミが高く、未同定ポリフェノール含量は国産クルミが高いことを示した。未同定成分の中にはエラジタンニン類も含まれ、文献によると抗酸化活性が強いステノフィラニン A がある<sup>18)</sup>。他のポリフェノールはフェニルプロパノイド類が考えられ、クルミはヒドロキシ桂皮酸、ヒドロキシ安息香酸などが抗酸化活性に関与していると Colaric ら<sup>36)</sup>の報告がある。自然界には多くのエラジタンニン類が複雑に混ざって存在するため、単離することは容易ではない。標品の入手も含め分離同定の進め方は今後の課題である。

各種ポリフェノール含量については Table 5 に示した。

国産、輸入クルミは含量に違いがある。各試料の共通点はペドゥンクラジン、テリマグランジン I、テリマグランジン II、カスアリクチン含量が高く、それに対してカスアリニン、ルゴシン C、エラグ酸の含量が低い。

テリマグランジン I は分子内にガロイル基とヘキサヒドロキシフェニル基 (HDDP 基) を複数有することから抗酸化活性が高い。国産クルミはテリマグランジン I 含量が 101.6 mg EAE/100 g-dry weight であるのに対し、輸入クルミはラジカル消去能が比較的到低いペドゥンクラジン含量が 107.8 mg EAE/100 g-dry weight と最も高い。同様に活性が高い成分はカスアリクチン、カスアリニン、ルゴシン C である<sup>18)</sup>。カスアリニンは輸入クルミが国産クルミの 1.6 倍であるが、含量が低い。ルゴシン C、カスアリクチン含量は僅かに輸入クルミが高い。これらのことから、国産クルミと輸入クルミのポリフェノール組成には違いがみられ、この違いが抗酸化能に反映する要因の 1 つになると示唆された。

Fukuda ら<sup>21)</sup> はペルシャクルミについて、ペドゥンクラジン、エラグ酸含量が特に高いと報告している。今回の結果はエラグ酸が低く、Fukuda らとは異なる結果であった。Li<sup>37)</sup> はカナダ産ペルシャクルミを用いた結果、エラグ酸含量は 0.32 g/kg と 0.25 g/kg と報告し、今回の結果と近い値である。

これらの結果から、ペルシャクルミ系統の国産、輸入クルミの抗酸化能とポリフェノール含量が違う理由として、1 つにはクルミの栽培環境が異なることがある。Wakeling ら<sup>38)</sup> や小嶋ら<sup>39)</sup> は果物、野菜のように、種実中のポリフェノール含量が環境要因、土壌成分、成熟の度合いによる影響を受けると述べている。

また、クルミは原産国のペルシャ (イラン) から世界各地に広がる過程で、商品価値が高い (仁が大きく、味が良い) 品種を生産するため、人為的な育種により、品種改良

を行ってきた<sup>26)</sup>。こうした経緯を踏まえ、その進化の過程がクルミの成分に影響したと推察される。

さらに、乾燥方法の違いがある。国産品はクルミを収穫後、天日乾燥を行う。それに対し、輸入品はクルミを収穫、機械洗浄後、プロパンガスのバーナーで湿度8%レベルまで乾燥させる<sup>40)</sup>。

一方、むきクルミは収穫後、クラッシャーで殻を割り、コンプレッサーにより殻を取り除き、取り出した仁はむき身状態で大きさ、色で選別される<sup>41)</sup>。一連の加工工程中に種皮が擦れて剥離することや、酸化が進む可能性が考えられる。

他にも、保存方法の影響がある。Bakkalbasi<sup>42)</sup>らは徐殻後のクルミは温度や酸素の影響により総ポリフェノール含量が減少し、抗酸化能も低下することを報告している。

以上の結果より、抗酸化能と総ポリフェノール含量は国産クルミが輸入クルミを上回った。エラジタンニン含量の合計値は輸入クルミが国産クルミを僅かに上回った。抗酸化成分は主要なエラジタンニン類の他にも未同定のポリフェノールが寄与することを示した。国産および輸入クルミのポリフェノール組成には違いがみられ、この違いが抗酸化能に反映していると考えられる。さらに、日本と米国の栽培環境が異なること、他にも育種、乾燥、保存方法の違いが関係していると考えられる。

国産クルミに関する一般成分、ポリフェノール組成の一部が明らかとなり、*in vitro*における抗酸化作用の知見を得た。今後はクルミを摂取後、生体内での抗酸化作用が期待できるため、検討したい。

## 要 約

国産クルミ (シナノクルミ, *J. regia* LINN.) の一般成分値を示した。

DPPH ラジカル消去法による抗酸化能の測定結果は国産クルミ 186.2  $\mu\text{mol TE/g-dry weight}$ , 輸入クルミ 144.8  $\mu\text{mol TE/g-dry weight}$  であり、国産クルミは輸入クルミより抗酸化能がやや高いことを示した。輸入むきクルミの抗酸化活性は 102.7  $\mu\text{mol TE/g-dry weight}$  であった。輸入むきクルミは殻付きクルミより抗酸化能が低いことを示した。

総ポリフェノール含量は国産クルミ 2202.3 mg GAE/100 g-dry weight, 輸入クルミ 1855.0 mg GAE/100 g-dry weight であり、国産クルミは輸入クルミよりやや高いことを示した。輸入むきクルミは 1216.9 mg GAE/100 g-dry weight は殻付きクルミよりポリフェノール含量が有意に低いことを示した。

各クルミの総ポリフェノール含量とラジカル消去能とは非常に高い正の相関がみられ、抗酸化成分はポリフェノールであることを示した。

クルミのポリフェノール組成は LC/MS, HPLC 分析の

結果、7種類の主要なエラジタンニンを同定した。国産クルミ 445.7 mg EAE/100 g-dry weight, 輸入クルミ 473.5 mg E-AE/100 g-dry weight であり、輸入クルミが国産クルミを僅かに上回った。輸入むきクルミは 281.6 mg EAE /100 g-dry weight であった。各クルミの主要なエラジタンニン含量合計値と抗酸化能との間には正の相関がみられ、抗酸化成分はエラジタンニン類であることを示した。また、未同定ポリフェノール含量と抗酸化能との相関も非常に高く、抗酸化能にはその他のポリフェノールも大きく寄与することを示した。

ペルシヤクルミ系統の国産クルミおよび輸入クルミについて、ポリフェノール組成には違いがみられ、この違いが抗酸化能に反映している。さらに、日本と米国では栽培環境が異なること、他にも育種、乾燥、保存方法が関係すると考えられる。

本研究の一部は、財団法人長野県科学振興会の助成を受けて行われたものであり、ここに記して感謝の意を表す。研究を遂行するにあたり、試験にご協力やご助言を頂いた長野県工業技術総合センター食品技術部門唐沢秀行氏、戸井田仁一氏、クルミの栽培、育種、加工についてご助言頂いた元信州大学繊維学部矢嶋征雄先生に心より感謝申し上げます。また、オリザ油化株式会社には標品を提供して頂き、特に下田博司氏にはご助言頂いたこと、日本くるみ会議、大室産業株式会社にはクルミ試料を提供して頂いたことに厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 「園芸植物大辞典」, 初版, 塚本洋太郎 (小学館, 東京) p.162 (1994).
- 2) 矢嶋征雄, クルミ, 「果樹台木の特性と利用」, 第1版, 河瀬憲次編, (農山漁村文化協会, 東京), p.457, (1995).
- 3) 安井明美, 種実類, 「日本食品大辞典」, 第1版, 杉田浩一, 田島 眞, 平 宏和, 安井明美編 (医歯薬出版, 東京), p. 94, (2003).
- 4) 「世界の食用植物文化図鑑」, 第1版, バーバラ・サンティック, ジェフ・ブライアント編, (柘風社, 東京), p.244 (2010).
- 5) Kris-Etherton, P.M, Yu-Poth, S., Sabaté, J., Ratclif, H.E., Zhao, G. and Etherton, T.D., Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70** (suppl), 504S-511S (1999).
- 6) Iwamoto, M., Imaizumi, K., Sato, M., Hirooka, Y., Skai, K., Takeshita, A and Kono, M. Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56**, 629-637 (2002).
- 7) Iwamoto, M., Sato, M., Kono, M., Hirooka, Y., Sakai, K., Takeshita, A. and Imaizumi, K. Walnuts lower serum cholesterol in Japanese men and women. *J. Nutr.*, **130**, 171-176 (2000).
- 8) Zambón, D., Sabaté, J., Muñoz, S., Campero, B., Casals, E., Merlos, M., Laguna, J.C. and Ros, E., Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial. *Ann. Intern. Med.*, **132**, 538-546 (2000).

- 9) Ros, E. and Mataix, J., Fatty acid composition of nuts-implications for cardiovascular health. *British Journal of Nutrition*, **96**, S29-S35 (2006).
- 10) Olmedila-Alonso, B., Granodo-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C. and Blanco-Navarro, I. Consumption of restructured meat products with added walnuts has a cholesterol-lowering effect in subjects at high cardiovascular risk: A randomised, crossover, placebo-controlled study. *Journal of the American College of Nutrition*, **27**, 342-348 (2008).
- 11) Tapsell, L.C., Owen, A., Gillen, J.L., Bare, M., Patch, C.S., Kennedy, M. and Batterham, M., Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, **27**, 2777-2783 (2004).
- 12) Pan, A., Sun, Q., Manson, J.E., Willett, W.C. and Hu, F.B., Walnut consumption is associated with lower risk of type 2 diabetes in women. *J. Nutr.*, **143**, 512-518 (2013).
- 13) Canales, A., Benedí, J., Nus, M., Librelotto, J., Sánchez-Montero, J.M. and Sánchez-Muniz, F.J., Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *Journal of the American College of Nutrition*, **26**, 225-232 (2007).
- 14) Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A.I. and Steinberg, F.M., Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J. Nutr.*, **131**, 2837-2842 (2001).
- 15) Blomhoff, R., Carlsen, M.H., Andersen, L.F. and Jacobs Jr, D. R., Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*, **96**, S52-S60 (2006).
- 16) Fukuda, T., Ito, H. and Yoshida, T., Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry*, **63**, 795-801 (2003).
- 17) Ito, H., Okuda, Takahiro, Fukuda, T., Hatano, T. and Yoshida, T., Two Novel Dicarboxylic Acid Derivatives and a New Dimeric Hydrolyzable tannin from Walnuts. **55**, 672-679 (2007).
- 18) 福田寿之, くるみ, 「植物ポリフェノール含有素材の開発—その機能性と安全性—」, 第1版, 吉田隆志, 有井雅幸(シーエムシー出版, 東京), p.303 (1995).
- 19) Shimoda, H., Tanaka, J., Kikuchi, M., Fukuda, T., Ito, H., Hatano, T. and Yoshida, T., Walnut polyphenols prevent liver damage induce by carbon tetrachloride and D-galactosamine: Hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4444-4449 (2008).
- 20) Shimoda, H., Tanaka, J., Kikuchi, M., Fukuda, T., Ito, H., Hatano, T. and Yoshida, T., Effect of polyphenol-rich extract from walnut on diet-induced hypertriglyceridemia in mice via enhancement of fatty acid oxidation in the liver. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1786-1792 (2009).
- 21) Fukuda, T., Ito, H. and Yoshida, T., Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. *Bio Factors*, **21**, 251-253 (2004).
- 22) 五訂増補食品成分表2010 5種実類, 初版, 香川芳子監修, (女子栄養大出版部, 東京), pp.44-45 (2009).
- 23) 古内幸雄, カシクルミの一般成分の経日変化, 長野県短期大学紀要, **41**, 7-15 (1986).
- 24) 羽生田忠敬, 「新編 原色果物図説」, 第1版, 小崎格監修, (養賢堂, 東京), pp.234-238 (1996).
- 25) 古内幸雄, テウチグルミおよびオニグルミのタンニン成分, 長野県短期大学, **46**, 9-15 (1991).
- 26) 矢嶋征雄, 渡辺泰光, 柳沢勝人, 庄村 茂, 茅野誠司, 小山田慎吾, 佐藤俊一, Merce Torra-Reventos, 山浦逸雄, 山中茂, シナノグルミ (*Juglans regia* L.)人為4倍体の減数分裂と花粉の性状, 園学雑, **72** (2), 134-140 (2003).
- 27) シナノクルミの系統分類に関する研究: I 果実の外部携帯について, 信州大学繊維学部研究報告, **8**, 22-31 (1958).
- 28) シナノクルミの系統分類に関する研究: II 果実の量的実用形質とその変異並びに量的形質による優良系統の選抜, 信州大学繊維学部研究報告, **10**, 39-55 (1960).
- 29) 滝田聖親, 渡部俊弘, 大石祐一, 服部一夫, 定量分析の実際, 「新基礎食品学実験書」, 初版, (三共出版, 東京), pp. 80-96, 113-115 (2010).
- 30) 須田郁夫, 機能性研究, 「食品機能研究法」, 篠原和毅他編, (光琳, 東京), pp. 218-220 (2000).
- 31) 津志田藤二郎, 機能性食品成分の分離・構造決定, 「食品機能研究法」, 篠原和毅他編, (光琳, 東京), pp. 318-322 (2000).
- 32) Kornsteiner, M., Wagner, K. and Elmadafa, I., Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, **98**, 381-387 (2006).
- 33) Abe, L.T., Lajolo, F.M. and Genovese, M., I., Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, **30**, 254-259 (2010).
- 34) Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the united states. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026-4037 (2004).
- 35) Li, L., Tsao, R., Yang, R., Kramer, J.K.G. and Hernandez, M., Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1164-1169 (2007).
- 36) Colaric, M., Veberic, R., Solar, A., Hudina, M. and Stampar, F., Phenolic acids, syringaldehyde and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6390-6396 (2005).
- 37) Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Zhu, H. and Young, J.C., Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8033-8040 (2006).
- 38) Wakeling, L.T., Mason, R.L., D'Arcy, B.R. and Caffin, N.A., Composition of pecan cultivars wichita and western schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] Grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1277-1281 (2001).
- 39) 菊道之, 宮下淳一, 前田龍一郎, 稲川 裕, 村松裕司, プラム中の抗酸化活性を有する機能性成分, 日本食品科学工学会, **52**, 507-511 (2005).
- 40) 矢嶋征雄, カリフォルニアのクルミ生産について (1), 信州の果実, **3**, 44-46 (1998).
- 41) 矢嶋征雄, カリフォルニアのクルミ生産について (2) 信州の果実, **4**, 35-37 (1998).
- 42) Bakkalbaşı, E., Menteş, Ö.M., Yemiş, O and Artik, N., Changes in the phenolic content and free radical scavenging activity of vacuum packed walnut kernels during storage. *Food Sci. Technol. Res.*, **19**, 105-112 (2013).

## 引用 URL

- i) <http://www.e-stat.go.jp/SGL/estat/List.do?lid=000001102429> (2013.8.1).
- ii) [http://www.jna-nut.com/us/yn\\_toke.html](http://www.jna-nut.com/us/yn_toke.html) (2014.5.26).

(平成 26 年 7 月 30 日受付, 平成 26 年 10 月 9 日受理)