

伝統野菜の総ポリフェノール含有量スクリーニングと スーパーオキシド消去活性

齋藤 佑¹, 日塔優太¹, 波多野豊平¹, 村上 聡², 尾形健明¹, 木島龍朗¹

伝統野菜の総ポリフェノール含有量スクリーニングとスーパーオキシド消去活性

齋藤 佑¹, 日塔優太¹, 波多野豊平¹, 村上 聡², 尾形健明¹, 木島龍朗¹

Superoxide Scavenging Activity and Colorimetric Total Polyphenol Content Analysis for Traditional Vegetables

Electron spin resonance (ESR) / spin-trapping technique is useful for analysis of superoxide scavenging activity. In general, significant correlation is observed between total polyphenol content and superoxide scavenging activity. Ukogi and wild vegetables as a traditional vegetables in Okitama area of Yamagata Prefecture were investigated by Pseudo-flow injection method combined new Folin-Ciocalteu colorimetric analysis. New Folin-Ciocalteu colorimetric analysis method were availability for screening of many sample materials by rapid processing using RGB digital analysis. Total polyphenol content of wild vegetables were apparently correlate to superoxide scavenging activity. Furthermore, it was found that superoxide scavenging activity depends on species (structure) of the polyphenol. We established the efficient screening method of superoxide scavenging activity of polyphenol compounds.

Keywords : Traditional vegetable, Total polyphenol content, Superoxide, Folin-Ciocalteu method, Electron spin resonance

Received August 26, 2016 ; Accepted November 15, 2016

1 緒言

活性酸素は、呼吸から取り入れた酸素が還元され、生体内で生じる活性種であり、様々な疾病の原因となることが知られている^{1,2)}。酸素の1電子還元種であるスーパーオキシド(O₂^{•-})は、フェ

ノール性水酸基を持つ、いわゆるポリフェノールで消去される事が知られ、その検出手法は多岐にわたり年々進化している³⁻¹⁵⁾。

近年、活性酸素を消去する抗酸化成分が注目されており、これらを含んだ健康食品や健康補助食品等が販売されているが、これら加工食品のみならず、野菜などの天然食品に含まれる機能性成分も注目されている。山菜を含む伝統野菜は、今の野菜にはない強い香りや、えぐみ、苦み、甘みや旨味といった多様な味が備わっており、これらに含まれる機能性成分にも強い興味を持たれているが、抗酸化機能を含めて詳細を調べた例はあまり

¹ Yu Saito, Yuta Nitto, Bunpei Hatano, Tateaki Ogata, Tatsuro Kijima,
山形大学 大学院理工学研究科 バイオ化学工学分野
山形県米沢市城南4丁目3-16 (〒992-8510)

² Satoshi Murakami
山形大学 工学部
山形県米沢市城南4丁目3-16 (〒992-8510)

ない。

我々の研究拠点である山形県米沢市を含む置賜地域は、第9代米沢藩藩主の上杉鷹山公により栽培が奨励されたウコギ（ヒメウコギ）を食する習慣があり、このウコギは、これまでに山田らによる精力的な研究が行われ、強い抗酸化活性を有することが報告されている¹⁶⁻²¹⁾。さらに共著者の1人である尾形健明（山形大学名誉教授・米沢うこぎ振興協議会会長（2015年設立））らによる食品としてのウコギの普及活動も行われている²²⁾。我々はESRスピントラップ法が、スーパーオキシド消去能評価に有効であり、総ポリフェノール量とスーパーオキシド消去能には高い相関性がみられることを報告した²³⁻²⁵⁾。一般に総ポリフェノール量は、Folin-Ciocalteu法²⁶⁾を用いて算出されるが、測定に長時間を要する欠点があった。一方、我々が報告した“改Folin-Ciocalteu法”はRGB処理でデジタル解析し、一度に大量のサンプルを短時間で処理することが出来る画期的な手法²⁷⁾であり、材料（試料）のスクリーニング等に有効な手段となりうる。

本論文では、ウコギや山菜を含む山形県置賜地域の伝統野菜について、改Folin-Ciocalteu法を用いての総ポリフェノール量分析およびスーパーオキシド消去能評価を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO) はLABOTEC社製を、ジメチルスルホキシド（脱水、DMSO）、エタノール（EtOH, 99.5 vol%）、過塩素酸テトラエチルアンモニウム（TEAP）、フェノール試薬（Folin-Ciocalteu試薬・塩酸2N相当）、炭酸ナトリウム（無水）、カテキン（本研究の標準物質）は和光純薬工業株式会社製を使用した。

DMSOは再結晶で精製し、TEAPは耐圧容器に入れ、減圧下で温水浴（60℃）に浸漬し、十分乾燥させたものを使用した。DMPOは、冷凍保存の、カテキンは冷蔵保存したものをそのまま使用し、それ以外は常温保存のものを用いた。特に標準試料に用いる（ポリ）フェノール類は、常温保存では変質しやすいので、購入後も低温保存した試薬を使用した。測定試料は、山菜（コシアブラ、ワラビ、ウルイ、シオデ、コゴミ、赤コゴ

ミ、青コゴミ、アズキナ、シドケ、タラの芽、アケビ、ゼンマイ、フキ、キノメ、ウド、フキノトウ、シドキ、ウコギ、ヤマウコギ、オカヒジキ）や野菜（ゴーヤ、ナス、シソ、モロヘイヤ、キュウリ、ハクサイ、ツルムラサキ、パセリ、シシトウ）を準備し、部位等の違いで124種に分類した後に使用した。

2.2 試料の調整・抽出

フェノール試薬は、イオン交換水であらかじめ2倍に希釈し、ストック溶液として使用した。炭酸ナトリウムはイオン交換水にて20 wt%に、EtOHは、80 vol%に調製したものを使用した。山菜は、80% EtOH溶液50 mLに10.0 gの試料を入れ、家庭用ミキサーやミルで粉碎したのちマグネチックスターラーを用いて10分間攪拌・抽出し、静置後、上澄み液を丁寧に採取して、これを試料溶液として用いた。一般に山菜・野菜には還元力の強いアスコルビン酸（水溶性ビタミンC）が含まれているため、抽出直後の試料溶液の総ポリフェノール量をFolin-Ciocalteu法で評価すると、アスコルビン酸の影響が大きく出てしまい、正確な評価ができない。そこで、通常はアスコルビン酸を還元、失活させるために、酵素：アスコルビン酸オキシダーゼで前処理を行い、さらに還元体として生成するデヒドロアスコルビン酸を吸光度補正する必要がある。しかし、今回は対象試料数が多いために、試料採取後、抽出した試料溶液を順次冷凍保存し、その後、使用した。この冷凍保存試料は、予備実験の段階でアスコルビン酸が失活状態であることが確認されたため、その後の実験では、アスコルビン酸オキシダーゼを添加せず、そのまま測定に使用した。

2.3 Folin-Ciocalteu法による食品サンプル中の総ポリフェノール量分析

既報の手順²⁷⁾に従い、改Folin-Ciocalteu法による総ポリフェノール量の定量を行った。マイクロプレートリーダー用のディスポーザブル96ウェルセルに、それぞれ100 μLの試料溶液、2倍希釈のフェノール試薬を入れ、3分間静置・反応後、20 wt%炭酸ナトリウム水溶液100 μLを混合し、10分間反応させた。炭酸ナトリウム水溶液添加後、気泡を除去し、マイクロプレートリー

ダーで 700 nm の吸光度を測定した. 同様の操作であらかじめ作成したカテキン (標準物質) の検量線 (Fig. 1) で, 試料の吸光度からカテキン当量でのポリフェノール濃度を決定した. さらに試料の総ポリフェノール量は 100 g あたりの試料が含むカテキン量 mg に換算した. 測定は, 各試料につき 3 回行い, 平均をとり, 同じ部位の試料が複数ある場合は, さらにすべての平均を示した. 特に高い総ポリフェノール量を示した試料を灰色で色付けした. (Fig.2)

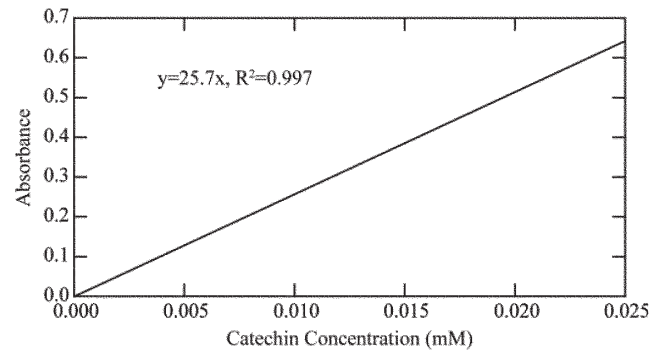


Fig. 1 Calibration curve of catechin

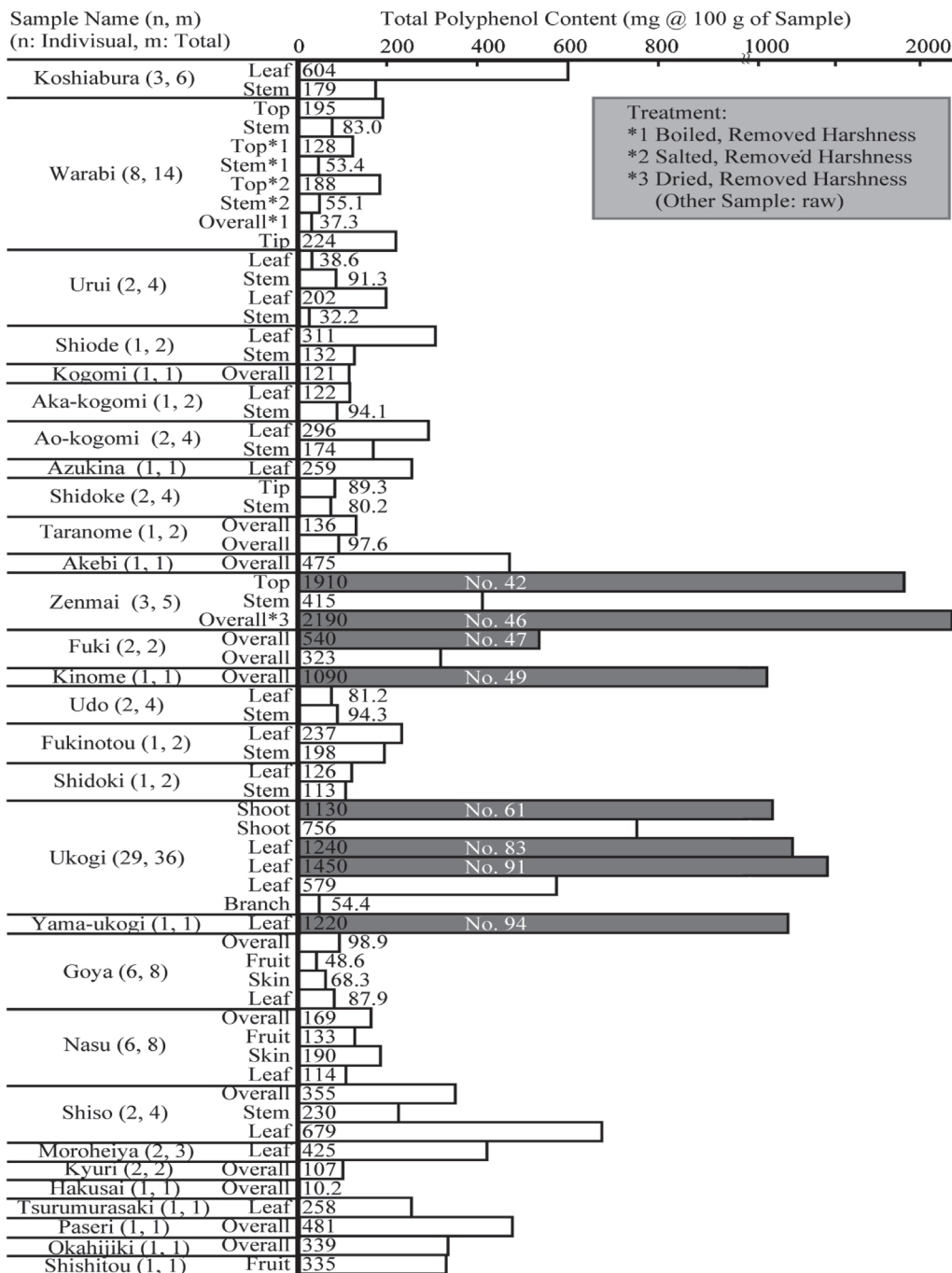


Fig. 2 Total Polyphenol Content about Traditional Vegetables and Vegetables

Table 2 Total Polyphenol Content and Superoxide Scavenging Activity

No.	Spec. of Traditional Food Name/Part/Condition	Folin-Ciocalteu Method*1			Pseudo flow-injection Method*2	
		Ratio*3	(mM)*4	(mg@100g)*4	Ratio*3	k*5
42	Zenmai/Tip/Raw	1/60	0.110	1910	0.00245	303
46	Zenmai/Overall/Dry	1/60	0.126	2190	0.00182	408
47	Fuki/Overall/Raw	1/30	0.0621	540	0.0217	34.2
49	Kinome/Overall/Raw	1/60	0.0627	1090	0.0114	65.1
61	Ukogi/Shoot/Raw	1/60	0.0647	1130	0.0126	59.0
83	Ukogi/Leaf/Raw	1/60	0.0711	1240	0.0217	54.1
91	Ukogi/Leaf/Raw	1/60	0.0830	1450	0.0101	73.3
94	Yama-ukogi/Leaf/Raw	1/60	0.0703	1220	0.00802	92.4

*1 Total Polyphenol Content, *2 Superoxide Scavenging Activity, *3 Dilution ratio against original concentration.

*4 The value was estimated from calibration curve to catechin equivalent *5 Slope of calibration curve

2.4 電解生成スーパーオキシドを用いた食品サンプルの消去能評価

電解生成スーパーオキシドの精製・測定は、既報の手順²⁵⁾に従って行った。スクリー管内で十分に乾燥させた TEAP を再結晶から脱水精製した無水 DMSO 5 mL に溶解させ、0.05 M (mol/dm³) 支持電解質溶液とした。調整した支持電解質溶液に、作用極 (WE) としてグラッシーカーボン (GC), 対極 (CE) として白金 (Pt), 参照極 (RE) として銀 (Ag) を浸漬し、これを電解セルとした。このセルにあらかじめ DMSO で飽和させた O₂ ガスを、ヘマトクリットキャピラリーを用いてバブリングし続けながら -0.75V vs. Ag で 10 分以上定電位電解し、電解生成スーパーオキシドを生成させた。コントロール条件下 (後述) で ESR 測定し、DMPO-OO[•] のアダクトを確認後、-0.4mA で定電流電解し続けることでスーパーオキシドの生成を維持した。

測定試料溶液 10 μL をマイクロテストチューブに入れ、リン酸緩衝液 (pH 7.8) 190 μL を加えて 20 倍の希釈溶液とした。これに 8.7 M (原液) DMPO 20 μL, 電解生成スーパーオキシド 50 μL を混合し、ペリスタルチックポンプで ESR 装置内に導入し、擬フローインジェクション法により測定を行った。各試料中のポリフェノール含有濃度は不明であるので、任意の割合で希釈した試料 (濃度) に対する ESR 信号強度を測定し、近似式を得ることで、単位質量あたりの ESR 信号強度を算出し、これをスーパーオキシド消去能とした。

3 結果と考察

3.1 試料中の総ポリフェノール量

山菜・野菜試料について、改 Folin-Ciocalteu 法による総ポリフェノール量を定量し、試料それぞれの吸光度からカテキン当量に換算した結果を Fig.2 にまとめた。コシアブラ: Koshiabura からシドキ: Shidoki (山形県小国産) では、単独で試料中の総ポリフェノール量がカテキン当量で 0.5 g 以上のものを、同様にウコギ: Ukogi からシシトウ: Shishitou (山形県米沢産) は、試料中の総ポリフェノール量がカテキン当量で 1.0 g 以上のものを高ポリフェノール含有試料とすると、高ポリフェノール含有試料は、試料 No.42, 46, 47, 49, 61, 83, 91, 94 で、それぞれゼンマイ (先端・未乾燥), ゼンマイ (乾燥), フキ (未乾燥), キノメ (未乾燥), ウコギ (新梢・未乾燥), ウコギ (葉・未乾燥), ウコギ (葉・未乾燥), ヤマウコギ (葉・未乾燥) であった。

ゼンマイは、えぐ味が強く、食用に適さない先端部分および乾燥したものに高いポリフェノール含有量が確認された。ゼンマイのえぐ味・渋味を感じさせる成分の一つにタンニンがあり、タンニンはカテキン類とその没食子酸エステル誘導体であることが知られている。これらは、フェノールやエピカテキンよりも高い還元能を有する²⁸⁻²⁹⁾ため、タンニンの含有量が多い先端部分が高い総ポリフェノール量を示したと考えられる。乾燥ゼンマイは、濃縮された分、総ポリフェノール量が増加したと考えられるが、食用に適するように灰汁抜き (アルカリ処理) を行っており、そのために、

かなりの量のポリフェノール類も除去されたと考えられるが、それでも最も高い総ポリフェノール量を示した。ウコギ・ヤマウコギは、単位質量あたりの食物繊維が多いことが報告³⁰⁾されているが、葉の老若（新梢かそうでないか）に関わらず、全体的に高いポリフェノール含有量を示した。上記以外の山菜・野菜では、キノメに高いポリフェノール含有量が確認された。そこで、以降は総ポリフェノール量の多かった8種類（No.42, 46, 47, 49, 61, 83, 91, 94）についてスーパーオキシド消去能の検討を行った。

3.2 スーパーオキシド消去能

各試料中のポリフェノール含有濃度は不明なので、任意の割合で希釈した試料（任意の濃度）に対する ESR 信号強度： $I_0/I-1$ を複数点測定することで、高い相関性 (R^2 が 0.971 ~ 1.00) を示す近似式を得た (Fig.3)。得られた近似式は、濃度変化に対する ESR 信号強度変化を表す一次式であり、式 (1) として表される。傾き k は単位質量あたりの ESR 信号強度となり、傾きが大きいほどスーパーオキシド消去能が高い。そこで今回は、この傾き k をスーパーオキシド消去能の指標とした。

$$I_0/I-1 = k [C_{\text{sample}}] \quad (1)$$

総ポリフェノール量が多い8種類の試料中、最もスーパーオキシド消去能が高かったものはゼンマイ (No.46) であり、ポリフェノール含有量とスーパーオキシド消去能には、相関性が認められた。ゼンマイ (No.46) のスーパーオキシド消去能は、フキ (No.47) の 11.9 倍であるのに対し、ポリフェノール含有量は、4 倍程度であり、単純な含有比率による比例関係にはなく、ポリフェノールの種類によるスーパーオキシド消去能の違い³¹⁾ が大きく影響していると考えられる。Fig.4 は、そのポリフェノール含有量とスーパーオキシド消去能の関係をプロットした相関図であるが、8種類の試料を2つの直線 ($y = 0.398x$, $y = 0.128x$) に近似、つまり2つに分類することができる。1つはゼンマイ (No.46, 42) のグループであり、もう1つは、それ以外のウコギ (No.61, 83, 91)、ヤマウコギ (No.94)、キノメ (No.49)、フキ (No.47) のグループである。主な含有成分としてタンパク質、炭水化物、食物繊維などが知られており

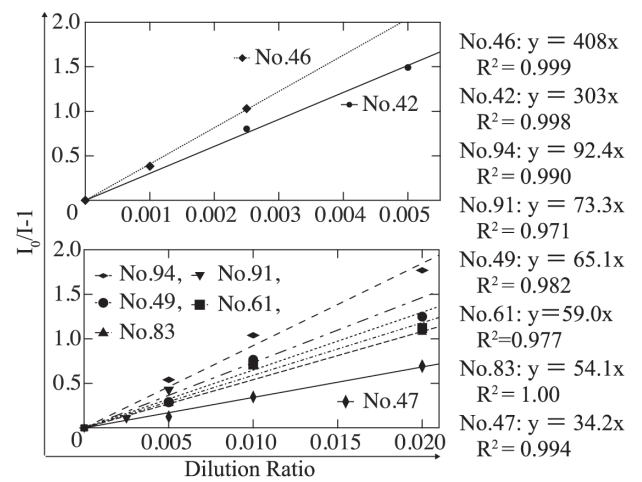


Fig. 3 Superoxide scavenging activity of traditional vegetables

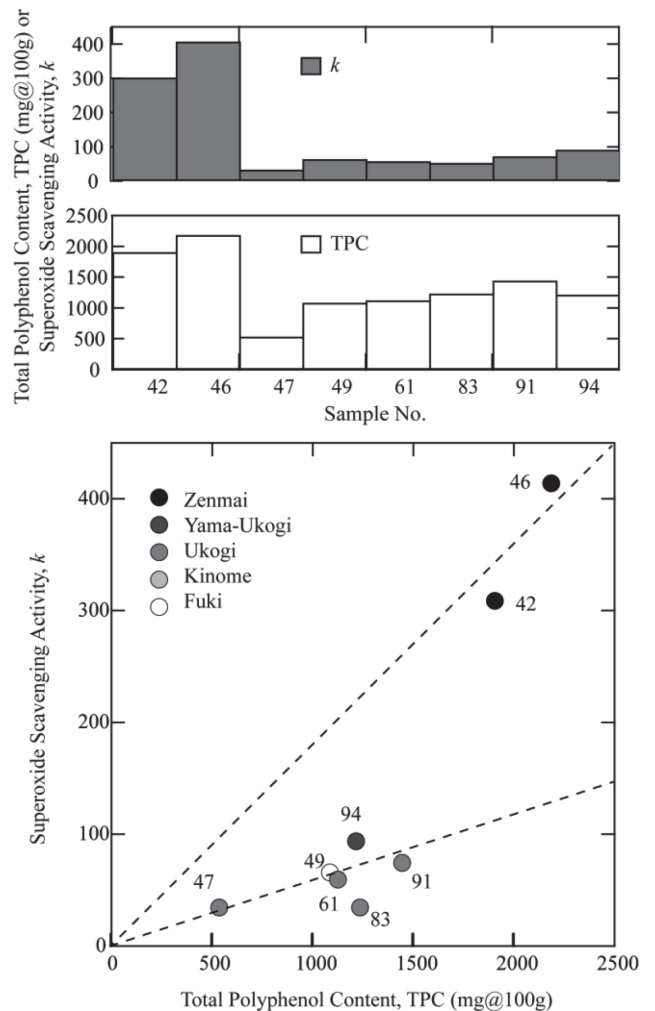


Fig. 4 Relationship among the total polyphenol content and superoxide scavenging activity
 Top: Superoxide scavenging activity (mg@100g of sample (catechin equivalent))
 Middle: Total polyphenol content (mg@100g of sample (catechin equivalent))
 Bottom: Relationship among superoxide scavenging activity and total polyphenol content

³²⁾ 例え食物繊維に関しては、生ゼンマイ 3.8g、干しゼンマイ 34.8g、フキ 4.2g、乾燥ウコギ 31g(いづれも 100g 中)となっているが、特に有意差は見られない。しかし、含有する主なポリフェノール類としてフキ、ウコギ、キノメにはカテコール骨格を有するクロロゲン酸が、また、ゼンマイには没食子酸様骨格を有するサイカシンが含まれることが知られており、これらの含有するポリフェノール類の種類と骨格の違いがスーパーオキシド消去能の差に寄与していると考えられる。

4 結言

今回、簡便な改 Folin-Ciocalteu 法(比色分析法)と、高度な擬フローインジェクション法(競争反応に基づくスーパーオキシド消去能評価法)を組み合わせることで、山菜・野菜の材料スクリーニングと含有ポリフェノールの消去能評価技術を確認することができた。本方法は、多種類の試料から効率よく短時間でスクリーニングできる評価技術の確立であり、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素、過酸化ラジカルなど、他の活性酸素種での評価技術に応用することで、広範囲な活性酸素種評価法となる可能性が期待できる。今後は、本技術でのスクリーニング試料の詳細分析を行い、活性酸素消去能の発現メカニズム解明を探求していく。

謝辞

本研究の一部は、本学と地域の高校との高大連携事業の一環で成し遂げられたものであり、試料提供をはじめ多くの支援を頂いた山形県立小国高等学校、山形県立米沢興譲館高等学校の教員および生徒の諸氏に謝意を表します。

参考文献

- 1) 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦, 活性酸素 - 生物での生成・消去・作用の分子機構 蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊号, 共立出版, 2654 (1988)
- 2) 浅田浩二, 活性酸素 - 生物での生成・消去・作用の分子機構 蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊号, 共立出版, 2659 (1988)

- 3) M. P. Montaña, W. A. Massad, F. Amat-Guerri, N. A. García, J. Photochem. Photophys. A, Chem., **193**, 103 (2008)
- 4) L. S. Yoshida, S. Kohri, S. Tsunawaki, T. Kakegawam T. Taniguchim H. Takano-Ohmuro, H. Fujii, J. Clin. Biochem. Nutr., **55**, 90 (2014)
- 5) K. Kawai, Y. Sakurai, K. Kanaori, C. Morimoto, A. Nakajima, K. Tajima, Appl. Magn. Reson., **40**, 449 (2011)
- 6) Y. Sakurai, T. Yamaguchi, A. Nakajima, K. Kanaori, K. Tajima, Chem. Lett., **43**, 527 (2014)
- 7) H. Ukeda, A. K. Sarker, D. Kawana, M. Sawaura, Anal. Sci., **15**, 353 (1999)
- 8) H. Ukeda, BUNSEKI KAGAKU, **53**, 221 (2004)
- 9) R. Komatsu-Watanabe, Y. Sakurai, C. Morimoto, S. Sakamoto, K. Kanaori, K. Tajima, Chem. Lett., **37**, 612 (2008)
- 10) Y. Sakurai, H. Sanuki, R. Komatsu-Watanebe, T. Ideguchi, N. Nagai, K. Kawai, K. Kanaori, K. Tajima, Chem. Lett., **37**, 1270 (2008)
- 11) Y. Sakurai, K. Kawai, R. Komatsu-Watanabe, C. Morimoto, S. Sakamoto, A. Nakajima, K. Kanaori, and K. Tajima, Chem. Lett., **38**, 662 (2009)
- 12) S. Hodaka, R. Komatsu-Watanebe, T. Ideguchi, S. Sakamoto, K. Ichimori, K. Kanaori, K. Tajima, Chem. Lett., **36**, 1388 (2007)
- 13) N. M. Sachindra, E. Sato, H. Maeda, M. Hosokawa, Y. Niwano, M. Kohno, K. Miyashita, J. Agric. Food Chem., **55**, 8516 (2007)
- 14) J. I. Kim, J. H. Lee, D. S. Choi, B. M. Won, M. Y. Jung, J. Park, J. Food Sci., **74**, C362 (2009)
- 15) M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, J. Clin. Biochem. Nutr., **46**, 224 (2010)
- 16) 田村朝子, 田渕三保子, 山田則子. 日本家政学会誌, **57**, 497 (2006)
- 17) 田村朝子, 田渕三保子, 山田則子, 日本家政学会誌, **56**, 451 (2005)

- 18) 田村朝子, 田渕三保子, 山田則子, 日本家政学会誌, **56**, 181(2006)
- 19) 本(田渕)三保子, 田村朝子, 山田則子, 日本栄養・食糧学会誌, **61**, 111 (2008)
- 20) 本三保子, 内田 菜穂子, 倉兼静江, 山田則子, 日本家政学会誌, **61**, 647 (2010)
- 21) 田渕三保子, 田村朝子, 松葉 滋, 小野寺準一, 山田則子, 日本栄養・食糧学会誌, **57**, 271 (2004)
- 22) 米沢うこぎ振興協議会編, 米沢の伝統野菜うこぎ (2015)
- 23) T. Koide, H. Noda, W. Liu, T. Ogata, K. Kamada, Analytical Sciences, **16**, 1029 (2000)
- 24) W. Liu, T. Ogata, S. Sato, K. Unoura, J. Onodera, Yakugaku Zasshi, **121**, 265 (2001)
- 25) Y. Saito, K. Yanagisawa, Y. Kimura, Y. Nitto, H. Noda, T. Kijima, T. Ogata, Studies in Science and Technol., **3**, (2014)
- 26) O. Folin, V. Ciocalteu, J. Biol. Chem., **73**, 627-650, (1927)
- 27) N. Fujita, Y. Saito, Y. Nitto, T. Ito, H. Mizuguchi, M. Endo, T. Ogata, Studies in Science and Technol., **1**, 139 (2013)
- 28) 芳野恭士, 廣田雅恵, 沼津高等工業専門学校研究報告, **34**, 147 (2000)
- 29) R. J. Tiitto, J. Agric. Food Chem., **33**, 213 (1985)
- 30) 山田則子, 田村朝子, 田渕三保子, 山形県立米沢女子短期大学紀要, **38**, 1, (2003)
- 31) T. Hatano, R. Edamatsu, M. Hiramatsu, A. Moti, Y. Fujita, T. Yasuhara, T. Yoshida, T. Okuda, Chem. Pharm. Bull., **37**, 2016 (1989)
- 32) 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂), 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会 報告