

赤、紫及び黒色を呈するカブの抗酸化作用とアントシアニンの関係、並びに酢の抗酸化増強作用

平松 緑^{1,2)} 高橋 知子²⁾
東北公益文科大学¹⁾・大学院²⁾

**Antioxidant action and anthocyanin concentration in turnips
with colors of red, purple, violet and
black, and increase in free radical scavenging activity of vinegar**

Midori Hiramatsu^{1,2)} and Tomoko Takahashi²⁾

Tohoku University of Community Service and Science¹⁾, Graduate
School, Tohoku University of
Community Service and Science²⁾

Free radical scavenging activity against 1,1-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical and concentration of anthocyanin in turnips with colors of red, purple, violet and black were studied using electron spin resonance spectrometry and HPLC, respectively. All colored samples of benishin-daikon, Fujisawa-kabu, Obanazawa-akakabu, kuro-daikon and Tsuruoka-akakabu were studied. All samples showed DPPH radical scavenging activity, and Tsuruoka-akakabu and Fujisawa-kabu showed the same grade of scavenging activity, which were highest in five samples. The scavenging activity of other samples were decreased Benishin daikon, Obanazawa akakabu and kuro-daikon, in order. The amount of anthocyanin was highest in Tsuruoka-akakabu and no anthocyanin was found in kuro-daikon. DPPH radical scavenging activity in pickles extract of Tsuruoka-akakabu was ten times higher than water extract of it. Apple vinegar and blueberry vinegar showed the same grade of DPPH radical scavenging activity. These results suggest that the difference of DPPH radical scavenging activity in five kinds of turnips may be due to contained anthocyanin, flavonoids and other antioxidants, and vinegar with turnip or fruit may bring higher free radical scavenging activity.

1. はじめに

老化に活性酸素・フリーラジカルが関係していることがHarman博士により提唱されて¹⁾から、この仮説を支持する多くの論文、さらには生活習慣病(がん、脳卒中、心臓病、糖尿病、腎臓病、認知症など)に活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレスが関わっている報告が現在まで数多く蓄積されている^{2,7)}。生体内の活性酸素・フリーラジカルは酸化・還元反応であり、細胞シグナリング、遺伝子発現、DNA障害、NADPHオキシダーゼ、転写因子、アポトーシス、動脈硬化、脳虚血、循環動態、発がんのがんの転移、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、てんかんなどの精神疾患および消化器疾患など脳から下肢までのありとあらゆるところに関わっていることが明らかにされている^{8,9)}。

またわれわれは漢方薬に活性酸素・フリーラジカル消去作用のあること¹⁰⁾、カテキンに活性酸素・フリーラジカル消去作用のあること¹¹⁾を最初に見出して以来、多くの果物・野菜、ハーブを含めた食材、食品、漢方薬に活性酸素・フリーラジカル消去作用すなわち抗酸化作用のあることが、数多く報告なされている^{12,13)}。またこれらの成分、すなわち、ポリフェノール、フラボノイド及びアントシアニンに抗酸化作用のあることが明らかにされ、これらの疫学研究も進められている¹⁴⁻¹⁶⁾。

最近、赤紫色の色素を有する玉ネギ、赤ネギ、サツマイモなどの野菜が見出されているが、これは色素成分であるフラボノイド及びアントシアニンの優れた抗酸化作用によるところが大きい。そこで赤色を呈するカブにおいて、抗酸化作用とアントシアニン含有量との関係について検討した。また庄内カキ酢に高い抗酸化作用のあることを見出した¹⁷⁾ので、さらにカブ酢漬汁及びブルーベリー酢について検討を加えた。

2. 実験方法

2-1 実験材料

根菜は紅芯大根、藤沢カブ、尾花沢赤カブ、黒大根及び鶴岡産赤カブ(焼畑

農法により栽培)を使用した(図1)。焼畑赤カブ酢漬け汁(山形県鶴岡市)は市販のものを使用し、リンゴ(山形県朝日町)酢は寿屋(山形県東根市)より、ブルーベリー(山形県鶴岡市羽黒町)酢は山形県農業総合研究センター(山形市)より醸造されたものを用いた。なおリンゴ酢及びブルーベリー酢の対照にはミツカンリンゴ酢(愛知県)及び庄内カキ酢¹⁷⁾をそれぞれ用いた。

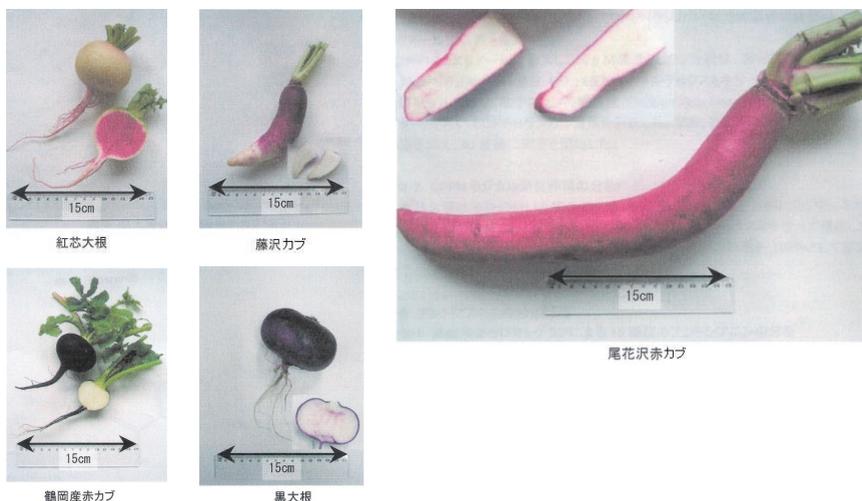


図1 紅芯大根、藤沢カブ、尾花沢赤カブ、黒大根と鶴岡産赤カブの写真

2-2 試料の調整

紅芯大根は実の赤色の部分を、藤沢カブ、尾花沢赤カブ、黒大根及び焼畑赤カブは皮を使用した。紅芯大根の実、藤沢カブ、尾花沢赤カブ及び黒大根の皮のそれぞれ0.5gに10倍量の水を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、3,000gで10分間冷却遠心をして得られた上清を実験に使用した。

焼畑赤カブ酢漬け液との比較には、焼畑赤カブの皮1gに5倍量の水を加え1週間暗所にて放置後、ホモゲナイザーにより磨砕し、3,000gで10分間冷却遠心をして得られた上清を実験に使用し、酢漬け液はこれを原液100%とした。リンゴ酢及びブルーベリー酢は原液を100%とした。

これらの試料の希釈には水を用いた。

2-3 フリーラジカルの分析

フリーラジカルの指標には1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル (和光純薬株式会社) を用いた。DPPHはエタノールに溶解し、 $30\ \mu\text{M}$ 濃度とした。分析には $30\ \mu\text{M}$ DPPH溶液 $100\ \mu\text{l}$ に試料溶液 $100\ \mu\text{l}$ を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、混合溶液を扁平セルにとり、電子スピン共鳴装置 (Electron Spin Resonance : ESR スペクトロメーター) を用いてDPPHラジカル濃度を測定した。なお測定はDPPH溶液に試料溶液を加えて60秒後に開始した。

2-4 アントシアニンの分析

2-4-1 アントシアニンの標準品

標準品には、ビルベリー (*Vaccinium myrtillus L.*, Bilberry) 抽出物に含まれる15種類のアントシアニン (表1) を用いた。

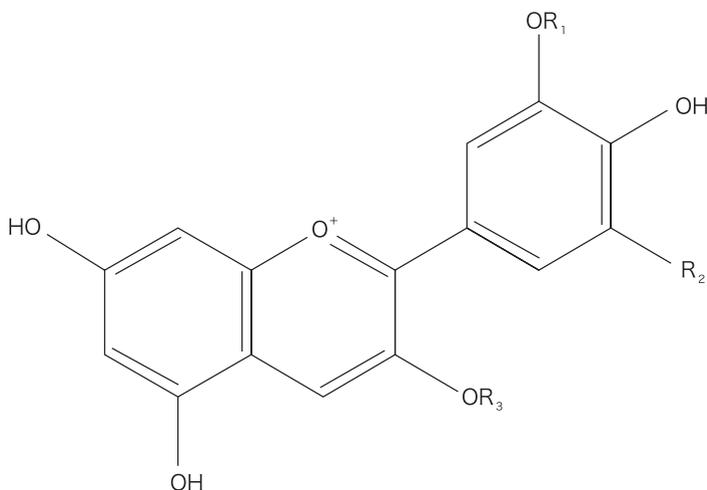


図2 Bilberon25に含まれる15種類のアントシアニンの構造

表1 ビルベリー抽出物に含まれる15種類のアントシアニン

No.	アントシアニン名	R ₁	R ₂	R ₃
1	Delphinidin 3- <i>o</i> -β-D-glucopyranoside	H	OH	glucoside
2	Delphinidin 3- <i>o</i> -β-D-galactopyranoside	H	OH	galactoside
3	Delphinidin 3- <i>o</i> -α-L-arabinopyranoside	H	OH	arabinoside
4	Cyanidin 3- <i>o</i> -β-D-glucopyranoside	H	H	glucoside
5	Cyanidin 3- <i>o</i> -β-D-galactopyranoside	H	H	galactoside
6	Cyanidin 3- <i>o</i> -α-L-arabinopyranoside	H	H	arabinoside
7	Petunidin 3- <i>o</i> -β-D-glucopyranoside	H	OCH ₃	glucoside
8	Petunidin 3- <i>o</i> -β-D-galactopyranoside	H	OCH ₃	galactoside
9	Petunidin 3- <i>o</i> -α-L-arabinopyranoside	H	OCH ₃	arabinoside
10	Peonidin 3- <i>o</i> -β-D-glucopyranoside	CH ₃	H	glucoside
11	Peonidin 3- <i>o</i> -β-D-galactopyranoside	CH ₃	H	galactoside
12	Peonidin 3- <i>o</i> -α-L-arabinopyranoside	CH ₃	H	arabinoside
13	Malvidin 3- <i>o</i> -β-D-glucopyranoside	CH ₃	OCH ₃	glucoside
14	Malvidin 3- <i>o</i> -β-D-galactopyranoside	CH ₃	OCH ₃	galactoside
15	Malvidin 3- <i>o</i> -α-L-arabinopyranoside	CH ₃	OCH ₃	arabinoside

2-4-2 アントシアニンの分析

アントシアニンの分析はIchiyanaqi et al.¹⁸⁾の方法に準じ、高速液体クロマトグラフにより次の条件にて分析を行った。ポンプ；P680 HPLC Pump (DIONEX Corporation, USA)、カラム；Develosil ODS-HG-5 4.6mm×150mm (野村化学株式会社、愛媛県)、ガードカラム；Develosilガードカートリッジホルダー 4.0mm×10mm、DevelosilガードカートリッジODS-HG 4.0mm×10mm (野村化学株式会社、愛媛県)、恒温装置；TCC-100 (DIONEX Coporation, USA)、検出器；UVA170/VIS Detector (DIONEX Corporation, USA)、流速；2.0ml/分、測定波長；520nm、カラム温度；40℃、移動相；5%トリフルオロ酢酸 (TFA) /メタノール：5%TFA/水 (1：4)。

2-4-3 試料の調整

紅芯大根は赤色の実の部分、その他の根菜は皮を実験に用いた。各0.5gに5% TFA/水を5ml加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、暗所にて一晚放置した。次いで3,000gで10分 (4℃) 遠心し、得られた上清を分析に使用した。

3. 実験結果

3-1 DPPHラジカル消去作用

15 μM DPPH溶液の電子スピン共鳴装置により得られたスペクトルを図3に示した。DPPHラジカルは5本のシグナルを検出した。両側の Mn^{2+} は外部標準のマンガンイオンのシグナルである。DPPHラジカル濃度はDPPHラジカル5本線のうち、最も高い、真ん中のシグナルの高さに対する左側のマンガンシグナルの高さの比（相対比）で示した。

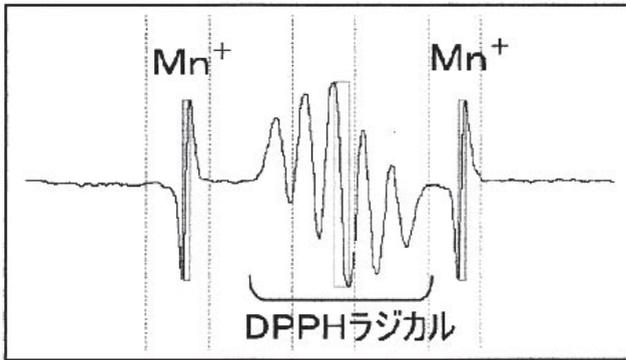


図3 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルのスペクトル

紅芯大根、藤沢カブ、尾花沢赤カブ、黒大根及び鶴岡産赤カブは濃度依存性にDPPHラジカルを消去した（図4）。鶴岡産赤カブと藤沢カブは同程度のラジカル消去作用を示していたが、紅芯大根、尾花沢赤カブ及び黒大根に比べて最も消去作用は大きかった。また、15 μM DPPHラジカルの IC_{50} （15 μM DPPHラジカルを半分消す濃度）は、鶴岡産赤カブが0.34%、藤沢カブが0.38%、紅芯大根が1.14%、尾花沢赤カブが3.64%、黒大根が34.09%であり、紅芯大根、尾花沢赤カブ及び黒大根においては、紅芯大根、尾花沢赤カブ及び黒大根の順にDPPHラジカル消去作用は低下した（図4）。なお、 IC_{50} の値は小さいほどDPPHラジカル消去作用は大きいことを示している。水溶性の代表的な抗酸化物、ビタミンCの IC_{50} は0.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。

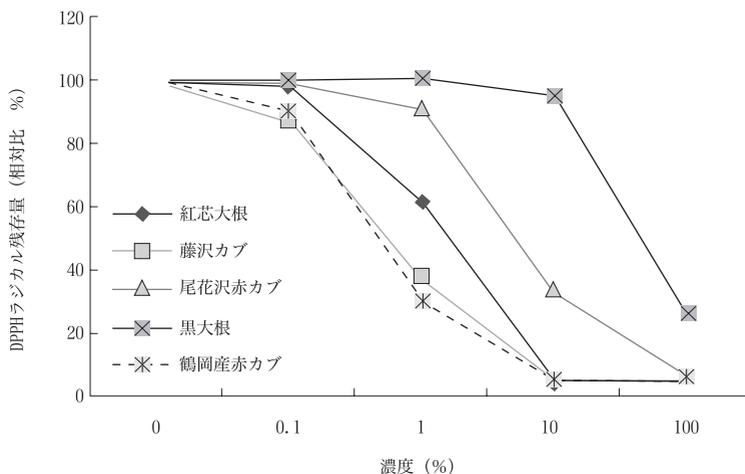
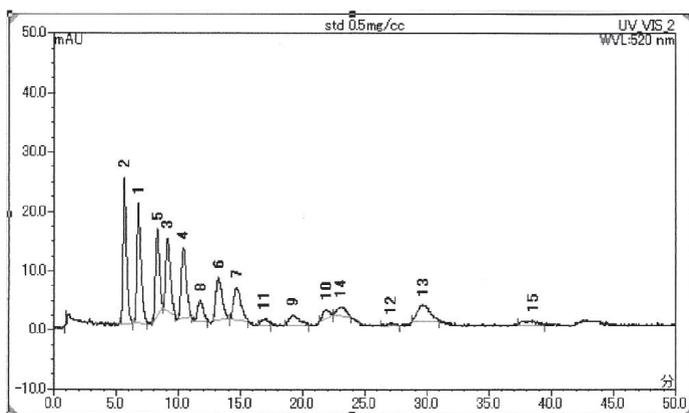


図4 カブ類の1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去作用の比較

3-2 アントシアニン含有量

アントシアニンの標準品としてBilberon 25に含まれる15種類のアントシアニン (表1) の分析例を図5に示した。各ピークの数字は表1のアントシアニン名の番号に相応する。また、鶴岡産赤カブの分析例を示した (図6)。



ピークナンバーは表1のアントシアニン No.に対応する

図5 Bilberon25の分析例

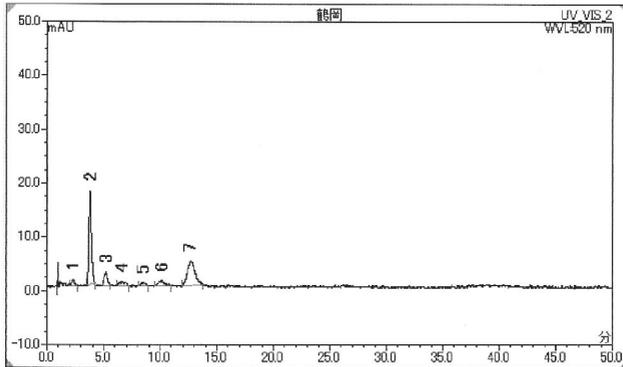


図6 鶴岡産赤カブの分析例

1: unknown 2: unknown 3: unknown 4: Delphinidin 3-*o*- β -D-galactopyranoside
5: unknown 6: unknown 7: unknown

紅芯大根においてはpetunidin 3-*o*- β -D-glucopyranosideと1本の未同定なピークが検出された。Petunidin 3-*o*- β -D-glucopyranosideの含有量は38.5 μ g/gであった。藤沢カブでは既知のアントシアニンのピークは認められないが、3本の未同定なピークが検出された。尾花沢赤カブではcyanidin 3-*o*- β -D-glucopyranoside、petunidin 3-*o*- β -D-glucopyranoside及び1本の未同定なピークが検出された。Cyanidin 3-*o*- β -D-glucopyranosideの含有量は52.5 μ g/g、petunidin 3-*o*- β -D-glucopyranosideの含有量は162.5 μ g/gであった。

黒大根においては既知及び未同定のピークは検出されなかった。鶴岡産赤カブにおいてはdelphinidin 3-*o*- β -D-galactopyranosideと6本の未同定のピークが検出された(図6)。Delphinidin 3-*o*- β -D-galactopyranosideの含有量は14 μ g/gであった。

3-3 5種類の根菜類のDPPHラジカル消去作用とアントシアニン含有量との相関関係

根菜類のDPPHラジカル消去作用とアントシアニン含有量との相関関係を図7に示した。アントシアニンについては未同定のピークが検出された試料があるため、検出されたピーク値の面積合計により値を算出した。アントシアニン含有量が高いほどDPPHのIC₅₀の値は低いので、DPPHラジカル消去作用が大きい傾向が認められた。

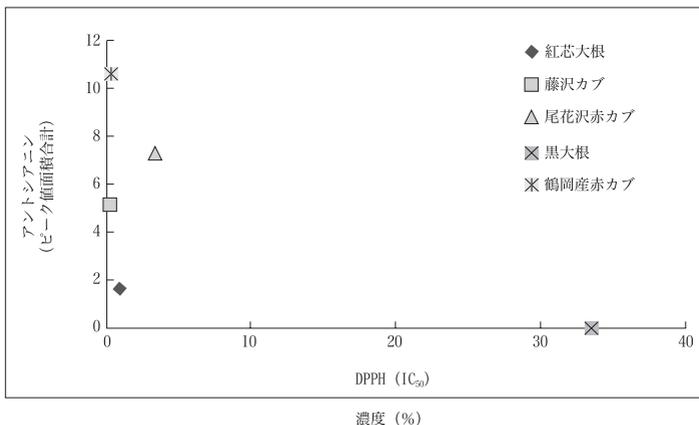


図7 5種類のカブの1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去作用とアントシアニン含有量との相関関係

3-4 根菜類の水抽出液と5%TFA抽出液の色の比較

黒大根の水抽出液と5%TFA抽出液の色は無色であった。他4種類の根菜類の水抽出液は淡いピンク色を呈していたが、5%TFA抽出液の色はこれらよりも非常に濃い赤色を示していた。水抽出液と5%TFA抽出液の色はほぼ平行し、最も濃い色を示していたのは鶴岡産赤カブであった。その次に続く濃い色は紅芯大根、藤沢カブ及び尾花沢赤カブでほぼ同じ色をいずれの抽出液でも示していた(図8)。

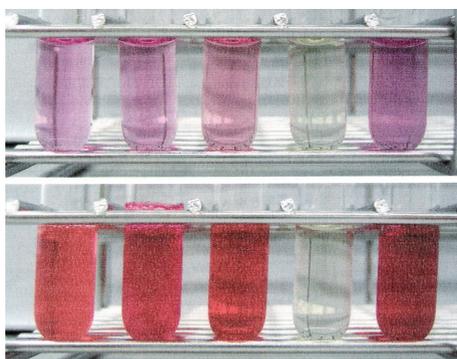


図8 カブ類の水抽出液と5%トリフルオロ酢酸 (TFA) 抽出液の色の比較

上段：水抽出液、下段：水(5%TFA)抽出液

左より紅芯大根、藤沢カブ、尾花沢赤カブ、黒大根、鶴岡産赤カブ

3-5 焼畑赤カブ酢漬け汁、リンゴ酢及びブルーベリー酢のDPPHラジカル消去作用

焼畑赤カブ抽出液及び焼畑赤カブ酢漬け汁は濃度依存性にDPPHラジカルを消去した（図9）。15 μ M DPPHラジカルのIC₅₀は焼畑赤カブ抽出液が3%、焼畑赤カブ酢漬け汁が0.25%であり、焼畑赤カブ酢漬け汁の方が約10倍ラジカル消去作用は大きかった。

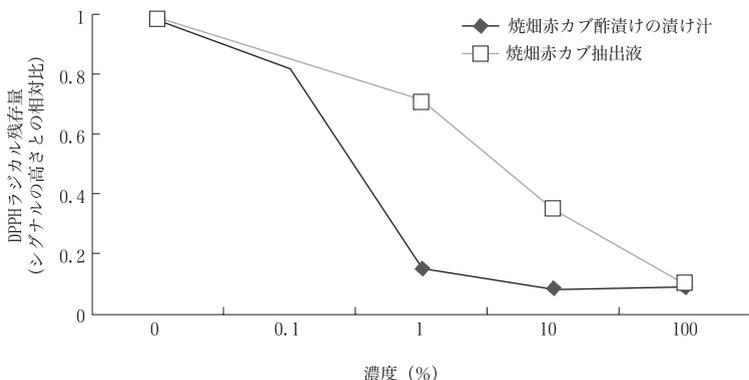


図9 焼畑赤カブ水抽出液と焼畑赤カブ酢漬け汁の1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去作用の比較

リンゴ酢はいずれも濃度依存的にDPPHラジカルを消去した（図10）。朝日町産リンゴ酢のIC₅₀は3%であり、明らかにミツカンリンゴ酢よりもラジカル消去作用は大きかった。

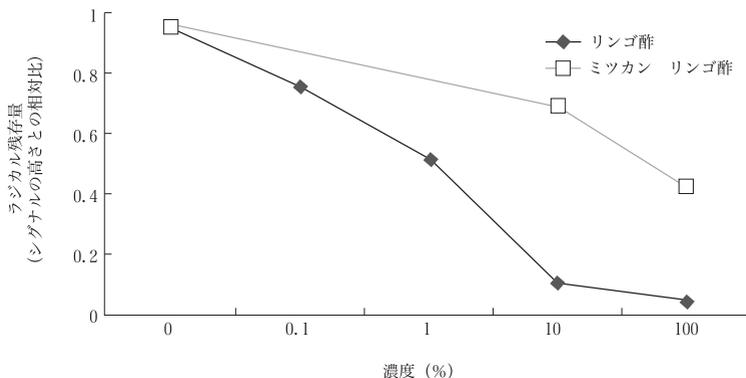


図10 リンゴ酢の1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去作用

ブルーベリー酢は濃度依存性にDPPHラジカルを消去した(図11)。庄内カキ酢と比較するとブルーベリー酢の方が少しラジカル消去作用は大きかった。ブルーベリー酢のIC₅₀は1.5%であった。

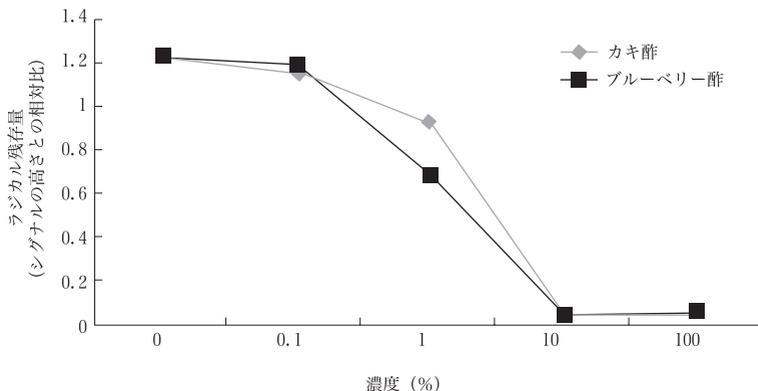


図11 ブルーベリー酢の1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去作用

考察

紅芯大根、藤沢カブ、尾花沢赤カブ、鶴岡産赤カブ及び黒大根はいずれもDPPHラジカル消去作用を示し、その作用の大きさは鶴岡産赤カブが最も大きく、次いで藤沢カブ、紅芯大根、尾花沢赤カブ、黒大根の順に小さくなった。目でみた水抽出液の色は鶴岡産赤カブが最も濃い色であり、最もDPPHラジカル消去作用の弱い黒大根はほとんど無色であった。

次にアントシアニン含有量についてみると、鶴岡産赤カブが未知のアントシアニン量をも含めて最も高い値を示し、次いで尾花沢赤カブ、藤沢赤カブ、紅芯大根の順に減少し、黒大根にはアントシアニンは検出されなかった。もちろんアントシアニンを含まない黒大根にはDPPHラジカル消去作用は最も5種類の根菜類の中では低い。黒大根にはそのほかフラボノイド、ビタミンC及び他の抗酸化成分が含まれていると思われる。

5%TFA抽出液の色は鶴岡産赤カブが最も濃い色を呈し、それと同時に最もアントシアニン量が多く含まれていた。標準品に用いた15種類のアントシアニンのうち、delphinidinのglucoside、galactoside及びarabinosideはいずれもスー

パーオキシド、ヒドロキシルラジカル及びパーオキシナイトレートイオンとよく反応し、これらへの抗酸化性は大きく、いずれにも消去作用の認められないのはpeonidin arabinoside、petunidin arabinoside及びmalvidin arabinosideである¹⁹⁾。鶴岡産赤カブにおいては作用のもっとも強いdelphinidinの galactosideが検出され、さらに未同定の6本のピークが認められている。これらのアントシアニンがDPPHラジカル消去作用を示している可能性が示唆される。

フラボノイドは水溶性及び脂溶性のものがあり、いずれも水素供与によるフリーラジカル消去作用が報告されている²⁰⁾。今回はアントシアニンとDPPHラジカル消去作用との関係について述べた。しかし、DPPHラジカル消去作用はほかの色素成分であるフラボノイドやポリフェノールの可能性も考えられる。

酢については、焼畑赤カブ酢漬けの漬け汁、ブルーベリー酢及びリンゴ酢のいずれにもDPPHラジカル消去作用が認められた。そのうち焼畑赤カブ酢漬けの漬け汁が最もDPPHラジカル消去作用が大きく、次いでリンゴ酢とブルーベリー酢が同等で焼畑赤カブ酢漬けの漬け汁よりは低い消去作用を示していた。朝日町産のリンゴ酢の方がミツカンリンゴ酢より消去作用はとて大きかった。米焼酎を造る際蒸留後に残る沈査物を酢酸で発酵醸造させた酢には抗酸化作用があり、四塩化炭素によるマウスの肝臓障害を抑制すること²¹⁾、サクラの花を漬けたプラム酢には活性酸素消去作用のあること²²⁾が報告されている。焼畑赤カブ、ブルーベリー、リンゴのいずれにもアントシアニンを含むフラボノイドやポリフェノール及び、酵母に抗酸化作用があることから、これらの発酵酢にはDPPHラジカル消去作用が認められたものと思われる。

引用文献

- 1) Harman D, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, J Gerontology 11:298-300, 1956
- 2) Hiramatsu M, Kohno M, Edamatsu R, Mitsuta K, Mori A, Increased superoxide dismutase activity in human cerebrospinal fluid and rat brain with age by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method, J Neurochem 58:1160-1164, 1991

- 3) 吉川敏一, フリーラジカルの科学, 講談社サイエンティフィック, 1997
- 4) 吉川敏一, フリーラジカルの医学, 診断と治療社, 1997
- 5) 日本栄養・食糧学会監修, フリーラジカルと疾病予防, 健ぱく社1997日本化学会監修, 活性酸素, 丸善株式会社, 1999
- 6) 吉川敏一, 河野, 野原一子, 活性酸素・フリーラジカルのすべて——健康から環境汚染まで——, 丸善株式会社, 2000
- 7) 大柳善彦, 井上正康, 活性酸素と老化制御, 共立出版株式会社, 2001
- 8) 平松緑, てんかんとフリーラジカル, 神経精神薬理16:217-226, 1994
- 9) 谷口直之, 淀井淳司, 酸化ストレス・レドックスの生化学, 共立出版, 2000
- 10) Hiramatsu M, Edamatsu R, Kohno M, Mori A, Scavenging of free radicals by Sho-saiko-to-go-keishikashayaku-to In: Hosoya E, Yamamura Y eds, Recent Advances in the Pharmacology of KAMPO, pp.120-127, Excerpta Medica, Tokyo, 1988
- 11) Uchida R, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I, Niwa M, Ozaki M, Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals, Med Sci Res 15:831-832, 1987
- 12) 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真, 抗酸化物質, 学会出版センター, 1996
- 13) 吉川敏一編, 抗酸化物質のすべて, 先端医学社, 1998
- 14) Ramesh E, Elanchezian R, Sakthivel M, Jayakumar T, Senthil Kumar RS et al, Green tea: beneficial effects on cholesterol and lipid metabolism besides endothelial function, Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 15:300-305, 2008
- 15) Nicklas TA, O'Neil CE, Kleinman R, Association Between 100% Juice Consumption and Nutrient Intake and Weight of Children Aged 2 to 11 Years, Arch Pediatr Adolesc Med, 162:557-565, 2008
- 16) Lu C, Bambang I, Armstrong JS, Whiteman M, Resveratrol blocks high glucose-induced mitochondrial reactive oxygen species production in bovine aortic endothelial cells: role of phase 2 enzyme induction? Diabetes, Obesity and Metabolism, 10: 347-349, 2008
- 17) 平松緑, 「最上紅花のはなびら入り庄内大豆」と「庄内柿酢」の抗酸化作用と健康について, 東北公益文科大学総合研究論集, 6:85-96, 2003
- 18) Ichianagi T, Hatano Y, Matsugo S, Konishi T, Structural dependence of HPLC separation on pattern of anthocyanins from bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*), Chem Pharm Bull 52, 628-630, 2004
- 19) Ichianagi T, Hatano Y, Reactivity of anthocyanin toward reactive oxygen and reactive species, In: Hiramatsu M, Yoshikawa T, Packer L eds, Molecular Interventions in Lifestyle-Related Diseases, Taylor & Francis, 339-345, 2006
- 20) Hirose Y, Washizu T, Uchida Y, Matsugo U, , In: Hiramatsu M, Yoshikawa T, Packer L eds, Molecular Interventions in Lifestyle-Related Diseases, Taylor &

Francis, 333-337, 2006

- 21) Seki T, Morimura S, Tabata, S, Tang Y, Shigematsu, T, Kida, K, Antioxidant activity of vinegar produced from distilled residues of the Japanese liquor shochu, *J Agric Food Chem* 56:3785-3790, 2008
- 22) Matsuura R, Moriyama H, Takeda N, Yamamoto K, Morita Y, Shimamura T, Ukeda H, Determination of antioxidant activity and characterization of antioxidant phenolics in the plum vinegar extract of cherry blossom (*Prunus Lannesiana*), *J Agric Food Chem*, 56:544-549, 2008