

原著論文

岡山県産黄ニラの抗酸化活性

川上 賀代子¹⁾, 有澤 鮎美¹⁾, 守谷 智恵¹⁾, 槇野 祐子²⁾, 畑中 唯史³⁾, 坪井 誠二^{1) *}

¹⁾ 就実大学薬学部生化学研究室, ²⁾ 岡山県農林水産総合センター 農業研究所

³⁾ 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所

Antioxidant activity of yellow Chinese chives

Kayoko Kawakami¹⁾, Ayumi Arisawa¹⁾, Chie Moritani¹⁾, Yuko Makino²⁾,
Tadashi Hatanaka³⁾, Seiji Tsuboi^{1) *}

¹⁾ *Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University*

²⁾ *Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries, Research Institute for Agriculture, Okayama*

³⁾ *Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries, Research Institute for Biological Sciences (RIBS), Okayama*

(Received 31 October 2017; accepted 7 December 2017)

Abstract: This study is aimed at assessing the antioxidant activity and the total polyphenol contents of yellow Chinese chives. Yellow Chinese chives sample were divided into edible parts (the stems of leaves) and inedible parts (the tip and bottom of leaves). The extracts of both parts showed potent superoxide anion radical (O_2^-) scavenging activity with IC_{50} values of 0.80 to 0.89 mg/mL. The inedible parts had total polyphenol contents approximately two-fold higher than that of edible parts. Next, we investigated that seasonal variation of O_2^- scavenging activity and the total polyphenol contents. The highest O_2^- scavenging activity was detected in sample harvested in May (IC_{50} values of 0.71 mg/mL). However, total polyphenol contents shown by samples harvested in May, August, October and December were almost similar. In order to find out the active components, yellow Chinese chives extract was subjected to Sep-pak C18 cartridge. The 40% methanol fraction (IC_{50} value of 0.29 mg/mL) showed the highest O_2^- scavenging activity.

Keywords: yellow Chinese chives; antioxidant activity; superoxide anion radical; polyphenol

緒言

活性酸素は酸素を代謝する過程で発生する反応性の高い副産物であり, スーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-), ヒドロキシラジカル ($HO\cdot$),

過酸化水素 (H_2O_2), 一重項酸素 (1O_2) などが知られている. 生体内で発生した活性酸素はスーパーオキシドジスムターゼなどの消去酵素やグルタチオンなどの抗酸化物質によって除去され

る。酸化ストレスは活性酸素とそれに対する防御反応のバランスが崩れ、酸化に傾く状態である。糖尿病、動脈硬化、脳血管疾患などの生活習慣病の発症には生体内での活性酸素による酸化ストレスの関与が示唆されており、抗酸化成分を含む農産物の摂取が、生活習慣病の治療や予防に有効であることが報告されている^{1, 2)}。これまでに、さまざまな地域特産の農産物の抗酸化活性が報告されている^{3, 4)}。農産物の抗酸化活性に寄与する成分としてアスコルビン酸やポリフェノールが挙げられるが、特にポリフェノールは抗酸化活性と相関が高いことが報告されている^{5, 6)}。そこで、我々のグループでも岡山県産農産物の付加価値を高めるために抗酸化活性に着目し、岡山県産農産物のスクリーニングを行った。その結果、黄ニラが O_2 消去活性が高く、総ポリフェノール量も高いことを報告した⁷⁾。

黄ニラは岡山県が生産量第1位であり、全国生産量の約7割を占めている岡山県の特産品のひとつである⁸⁾。黄ニラは青ニラと同じニラの品種であるが栽培方法が異なる。黄ニラは、青ニラの地上部を刈り取り、被覆資材で太陽光を遮断する軟化栽培による周年出荷の野菜であり、先端と下端を切断して出荷される。そこで本研究では、黄ニラの部位別と時期別の抗酸化活性の解析を行ったので報告する。

方法

1. 試料の調製

黄ニラは岡山県農林水産総合センター農業研究所において栽培されたミラクルグリーンベルト(武蔵野種苗園)を使用した。部位別の抗酸化活性を比較するため、可食部(中間部)と廃棄部(出荷時に切断される先端および下端)に分けた。黄ニラは通常、太陽光を遮断して栽培し、収穫されるが、栽培期間の途中で1~3時間程度、太陽光に暴露(露光)することで葉の黄色が濃くなる⁹⁾。そこで、露光ありと露光なしの黄ニラ(2016年8月17日収穫)を使用した。また、収穫時期

による違いを検討するために、5月(2016年5月24日収穫)、8月(2016年8月17日収穫)、10月(2016年10月25日収穫)、12月(2016年12月19日収穫)した可食部を使用した。黄ニラは試料の調製(2017年6月)まで -30°C で保存した。黄ニラ100gあたりに100mLの50%エタノールを加え、フードプロセッサーで破碎した。スターラーで攪拌しながら1時間抽出した。得られた抽出液を吸引ろ過し、ろ液を凍結乾燥した。凍結乾燥試料を、10mg/mLになるようにミリQ水で溶解し、試料とした。比較対象としてミラクルグリーンベルトを露地栽培した青ニラ(2016年8月31日収穫)も同様に50%エタノールで抽出し、試料とした。

2. 黄ニラ抽出物の分画

黄ニラ抽出物2.4gをミリQ水に再溶解し、Sep-Pak C18 35 cc Vac Cartridge(日本ウォーターズ)に供した。0%メタノール(ミリQ水)、5%メタノール、10%メタノール、20%メタノール、40%メタノール、100%メタノール(各50mL)で溶出させた。各溶出液は凍結乾燥または減圧濃縮後、100mg/mLになるようにdimethyl sulfoxideに溶解して試料とした。

3. スーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)消去活性の測定

既報⁷⁾と同様に測定を行った。試料20 μL を96穴プレートに添加し、反応溶液160 μL [125mMリン酸バッファー(pH7.5)、20 μL 、5mMヒポキサンチン20 μL 、2.5mMニトロブルーテトラゾリウム1 μL 、ミリQ水119 μL]を添加後、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5分で加温した。0.34mg/mLキサンチンオキシダーゼ(和光純薬工業)を20 μL 添加し、595nmの吸光度の変化をマイクロプレートリーダーで測定した。標準物質としてグルタチオンを使用した。50% O_2^- 消去活性(IC₅₀値)は試料の代わりにミリQ水を添加したときの消去率をコントロール(100%)として算出した。

4. 総ポリフェノール量の測定

総ポリフェノール量の測定は既報⁷⁾と同様に

行った。試料 15 μL を 96 穴プレートに添加し、フォーリンーチオカルト試薬(シグマアルドリッチ) 15 μL を添加した。ミリ Q 水 140 μL を添加し 3 分静置後、10% Na_2CO_3 30 μL を添加した。1 時間静置後、760 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。標準物質として没食子酸(ナカライテスク)を使用し、得られた検量線から総ポリフェノール量を算出した。

5. 統計処理

エクセル統計 Statcel 3 アドインソフト(オーエムエス出版)を用い、Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。

結果・考察

黄ニラの部位別と収穫時期別の O_2 消去活性と総ポリフェノール量を調べた。部位別で比較すると、 O_2 消去活性は、廃棄部、可食部ともに IC_{50} 値は約 0.8 mg/mL であり、有意差は見られなかった(表 1)。一方、総ポリフェノール量は廃棄部の方が可食部より約 2 倍高いことが分かった(図 1)。つまり、廃棄部のほうが可食部よりも総ポリフェノール量が高かったが、 O_2 消去活性は両部位ともにほぼ同じ値を示した。収穫時期別の O_2 消去活性を調べた結果、5 月収穫の黄ニラの活性が最も高く、冬季にかけて活性が低くなる傾向が見られた(表 2)。総ポリフェノール量は 8 月が最も低く、10 月が最も高かった(図 2)。よって、季節により成分の変動があることが示唆された。黄ニラのアスコルビン酸含有量の変動を調べた報告¹⁰⁾によると、アスコルビン酸量は夏季に低く、冬季に高い傾向を示す。以上の結果から、黄ニラの抗酸化活性に寄与している成分はアスコルビン酸やポリフェノール以外の可能性が示唆された。

黄ニラの露光処理は夏季における黄色の発色改善のために行われている。一方で、ブロッコリースプラウトの生育期間中に照射する光強度を高めるとポリフェノール量が増加し、抗酸化活性が高まるという報告がある¹¹⁾。そこで、黄ニラの

表 1 部位別の黄ニラの 50% O_2 消去活性

		IC_{50} 値 (mg/mL)
廃棄部	露光あり	0.80 \pm 0.09
	露光なし	0.80 \pm 0.06
可食部	露光あり	0.89 \pm 0.03
	露光なし	0.83 \pm 0.03

n=3, 平均 \pm SD

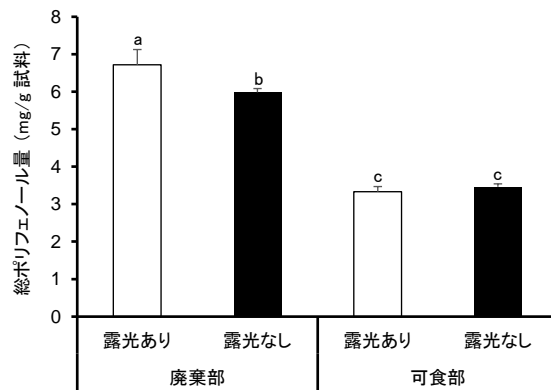


図 1 部位別の黄ニラ抽出物の総ポリフェノール量 (n=3, 平均 \pm SD, a, b, c, $p < 0.05$, Tukey-Kramer test)

表 2 収穫時期別の黄ニラの 50% O_2 消去活性

		収穫時期	IC_{50} 値 (mg/mL)
青ニラ	8月	0.88 \pm 0.05	a
	黄ニラ	5月	0.71 \pm 0.02
黄ニラ	8月	0.79 \pm 0.02	a, b, c
	10月	0.86 \pm 0.00	a, c, d
	12月	0.92 \pm 0.07	a, d

n=3, 平均 \pm SD, a, b, c, d, $p < 0.05$, Tukey-Kramer test

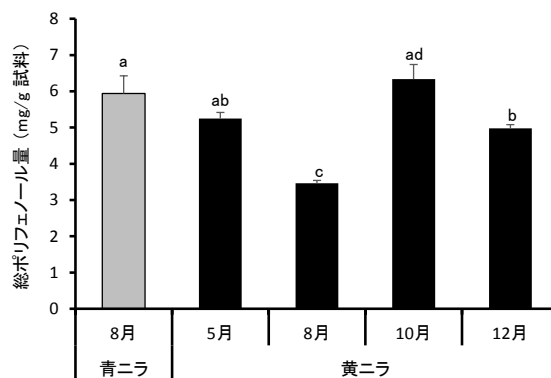


図 2 収穫時期別の黄ニラ抽出物の総ポリフェノール量 (n=3, 平均 \pm SD, a, b, c, d, $p < 0.05$, Tukey-Kramer test)

表 3 黄ニラ分画物の収量

	収量(mg)	収率(%)
0%メタノール画分	2341.6	98.3
5%メタノール画分	15.5	0.7
10%メタノール画分	8.6	0.4
20%メタノール画分	5.5	0.2
40%メタノール画分	3.7	0.2
100%メタノール画分	7.6	0.3
合計	2382.5	100.0

表4 黄ニラ分画物の 50%O₂ 消去活性

	IC ₅₀ 値 (mg/mL)
グルタチオン	1.69 ± 0.02 ^a
0%メタノール画分	1.49 ± 0.15 ^a
5%メタノール画分	0.46 ± 0.06 ^b
10%メタノール画分	0.56 ± 0.11 ^b
20%メタノール画分	0.59 ± 0.09 ^b
40%メタノール画分	0.29 ± 0.01 ^{b,c}
100%メタノール画分	0.76 ± 0.07 ^{b,d}

n=3, 平均±SD, ^{a, b, c, d}p < 0.05, Tukey-Kramer test

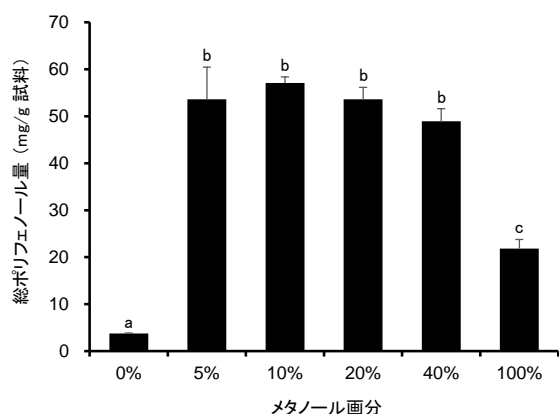


図3 黄ニラ分画物の総ポリフェノール量 (n=3, 平均±SD, ^{a, b, c, d}p < 0.05, Tukey-Kramer test)

収穫前に露光処理を行うことで抗酸化活性を高めることができると予想されたので、収穫前に露光処理を行い、O₂消去活性と総ポリフェノール量を比較した。廃棄部で露光処理によるポリフェノール量の増加が見られたが、O₂消去活性に差はみられなかった(図1, 表1)。さらに、同時期(8月)に収穫した青ニラと黄ニラを比較すると、青ニラの総ポリフェノール量の方が1.7倍高かった(図2)。しかし、O₂消去活性は青ニラより黄ニラの方が高かった(表2)。以上の結果から、露光処理によりニラ中のポリフェノール量の増加はみられるが、ニラのO₂消去活性は露光処理によって影響を受けないことがわかった。部位別および収穫期別の結果と同様に、黄ニラ中のポリフェノール量と抗酸化活性の相関が見られないことから、ニラの主なO₂消去活性成分はポリフェノール以外であると考えられた。

次に、黄ニラのO₂消去活性成分を同定するた

め、Sep-Pak C18 Cartridge で成分の分画を行った。分画物の収量から、黄ニラ抽出物中の98%がCartridgeに非吸着の画分(0%メタノール画分)に溶出しており、黄ニラ抽出物には親水性が高い成分が多いことが分かった(表3)。O₂消去活性を調べた結果、0%メタノール画分より、5%から100%メタノール画分、つまり疎水性の高い画分にO₂消去活性があり、40%メタノール画分の活性が最も高く、IC₅₀値は0.29 mg/mLであった(表4)。また、すべての画分でグルタチオンよりも高いO₂消去活性を示した。総ポリフェノール量を調べた結果、0%メタノール画分の総ポリフェノール量が最も低く、3.7 mg/g 試料であった(図3)。5%メタノール画分から40%メタノール画分の総ポリフェノール量には有意差はなかったが、100%メタノール画分では22 mg/g 試料であり、前述の画分に比べて低い値を示した。黄ニラが属するネギ属の葉肉細胞に含まれるメチンやアリインは酵素(アイリナーゼ)により、様々な含硫化合物に変化し¹²⁾、S-alkyl-L-cysteine sulfoxideにはリノール酸酸化抑制能が報告されている¹³⁾。また、ニラの種子に含まれるO₂消去活性ペプチドとしてGly-Ser-Glnが報告されている¹⁴⁾。黄ニラの活性成分として含硫化合物やペプチドが考えられるが、更なる研究が必要である。

本研究により、5月収穫の黄ニラのO₂消去活性が最も高いことが明らかとなった。また、活性成分の同定を試みたところ、40%メタノール画分に活性成分が含まれていることが考えられた。さらに、総ポリフェノール量とO₂消去活性には相関が見られなかったため、黄ニラのO₂消去活性成分はポリフェノール以外の成分であることが示唆された。現在、40%メタノール画分の更なる分画をすすめ、黄ニラのO₂消去活性成分の同定を試みている。

謝辞

本研究は岡山県外部知見活用型・産学官連携研究事業の一環として行いました。

引用文献

- 1) Bazzano L.A., He J., Ogden L.G., Loria C.M., Vupputuri S., Myers L., and Whelton P.K.: Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 93-99 (2002).
- 2) Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Kromhout D., Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Hertog M. G. L. and Katan M. B.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet.* **342**, 1007-1011 (1993).
- 3) 木村 俊之, 山岸 賢治, 鈴木 雅博, 新本 洋士: 農産物のラジカル消去能の検索. *日本食品科学工学会誌.* **49**, 257-266 (2002).
- 4) 伊藤 史, 水口 聡, 石々川 英樹: 愛媛県産地域農産物の抗酸化能および総ポリフェノール含量による評価. *愛媛県農林水産研究所報告.* **2**, 43-51 (2010).
- 5) 須田 郁夫, 沖 智之, 西場 洋一, 増田 真美, 小林 美緒, 永井 沙樹, 比屋根 理恵, 宮重 俊一: 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性. *日本食品科学工学会誌.* **52**, 462-471 (2005).
- 6) 木村 俊之, 山岸 賢治, 鈴木 雅博, 老田 茂: 農産物におけるラジカル消去能と総ポリフェノール量に関する一考察. *東北農業研究.* 237-238 (2005).
- 7) 川上 賀代子, 松尾 泉里, 守谷 智恵, 畑中 唯史, 坪井 誠二: 岡山県産農産物の抗酸化活性. *就実大学薬学雑誌.* **4**, 32-36 (2017).
- 8) 岡山県農林水産部農政企画課ホームページ. <http://www.pref.okayama.jp/page/detail-26757.html>.
- 9) 岡 修一: ニラの軟白栽培における露光処理が葉色に及ぼす影響. *岡山県農業研報.* **6**, 25-29 (2015)
- 10) 加賀田 江里, 村上 淳, 多田 幹朗, 北島 葉子, 笠間 基寛, 嶋田 義弘: 青ニラおよび黄ニラのビタミン C 含有量の周年変動. *中国学園紀要.* **13**, 1-6 (2014).
- 11) 前川 健二郎, 前田 智雄, 大島 千周, 鈴木 卓, 大澤 勝次: 数種アブラナ科スプラウトの抗酸化成分含量 および抗酸化能に及ぼす照射光強度の影響. *園芸学研究.* **5**, 315-320 (2006).
- 12) Yabuki Y., Mukaida Y., Saito Y., Oshima K., Takahashi T., Muroi E., Hashimoto K. and Uda Y.: Characterisation of volatile sulphur-containing compounds generated in crushed leaves of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler). *Food Chemistry.* **120**, 343-348 (2010).
- 13) 内藤 茂三, 山口 直彦, 横尾 良夫: ネギ類植物からの抗酸化物質の検索-天然抗酸化物質に関する研究(第 2 報). *日本食品工業学会誌.* **28**, 291-296 (1981).
- 14) Hong J., Chen T.-T., Hu P., Yang J. and Wang S.-Y.: Purification and characterization of an antioxidant peptide (GSQ) from Chinese leek (*Allium tuberosum* Rottler) seeds. *Journal of Functional Foods.* **10**, 144-153 (2014).