食用キク栽培品種のフラボノイドとポリフェノール画分のラジカル消去活性

菅原哲也[§], 五十嵐喜治*

山形県工業技術センター庄内試験場特産技術部

* 山形大学農学部生物資源学科

Cultivar Variation in Flavonoid Components and Radical Scavenging Activity of Polyphenol Fractions Among Edible Chrysanthemum Flowers

Tetsuya Sugawara[§] and Kiharu Igarashi*

Yamagata Research Institute of Technology, Shonai Testing Facility, 25 Sakuragi, Oshikiri-shinden, Mikawa-machi, Yamagata 997-1321

* Faculty of Agriculture, Yamagata University, 1-23 Wakaba-machi, Tsuruoka, Yamagata 997-8555

The amount of major flavonoids and radical scavengers were determined in 4 cultivars of edible chrysanthemum flowers (*Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat. forma *esculentum* Makino) grown in Yamagata Prefecture, Japan, to examine the relationship between the characteristics of flavonoid components and radical scavenging activity. Flavonoid components in petals of edible chrysanthemum flowers differed greatly depending on the cultivar. Radical scavenging activity of polyphenol fractions prepared from each cultivar was the strongest in Mottenohoka which has yellow petals, followed by Kotobuki, Iwakaze and Mottenohoka which have pale purple petals. Luteolin 7-O-(6''O-malonyl)-glucoside, a major flavonoid with the strongest radical scavenging activity, was the most predominant in the yellow petals of the edible chrysanthemum flower Mottenohoka.

(Received Jun. 26, 2009 ; Accepted Aug. 10, 2009)

Keywords : edible chrysanthemum flower, flavonoids, radical scavenging activity

キーワード : 食用キク, フラボノイド, ラジカル消去

食用キク (*Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat. forma *esculentum* Makino) はキク科, キク属 (*Chrysanthemum* L. sensu ampl.) の多年草であり, 中国原産で 8 世紀に日本へ渡来し, 花卉を食する習慣は江戸時代から始まったとされている¹⁾. 山形県は食用キクの生産規模が全国 1 位であり, 作付面積が 154 ha, 年間収穫量が 1280 t である (平成 17 年)¹⁾. また, 現在, 東京中央卸売市場で扱う食用キクの 6 割以上は山形県産が占めており¹⁾, 電照での抑制栽培, ハウス栽培等を導入し, 数種類の栽培品種を組み合わ

せて周年出荷が可能となっている.

山形県で栽培される食用キクの中で代表的なものが, 秋 (10~12 月) に収穫される 'モッテノホカ' (栽培品種) である. 'モッテノホカ' は山形県内各地で古くから栽培されてきた伝統野菜であり, 花卉の形状は小花・管状で, 花色は黄色および淡い紫色の 2 種が栽培されている. また, 共に近年, 育種・登録された栽培品種であり, 春 (3~5 月) に収穫される 'イワカゼ' (栽培品種), 夏 (8~10 月) に収穫される 'コトブキ' (栽培品種) は, 収穫量が多く, 花卉の形状は小花・平状で, 花色は黄色である.

食用キクは, 現在では主に「おひたし」や「酢の物」として食されるが, 元来中国では不老長寿の霊草とされ, 薬用として利用された経緯がある¹⁾²⁾. これまで食用キクの生理機能や活性成分に関して様々な報告があり³⁾⁴⁾, 近年, 健康維持や各種疾病の予防に効果があるとされているポリフェノール成分が注目されている. われわれは, 食用キク ('コトブキ') に含まれる主要なフラボノイド 6 種を同定し, その中でもルテオリンおよびルテオリン 7-O-(6''-O-マロニル)-グルコシドはマウスにおいて四塩化炭素が誘導する肝障害を有意に抑制することを報告した⁵⁾. しかしながら, 本県で栽培される食用キクの各栽培品種において, フラボノイド組成や, そのラジカル消去活性について, 詳細な報告は, これまで行われていない. また, 食用キク各栽培品種において, それぞれのフラボノイド含有量を明らかにすることは, 食用キクの高付加価値化, さらに, より高機能な栽培品種の育種・選抜に大きく寄与するものと考えられる.

そこで, 本研究において, 山形県で栽培される主要な食用キク各栽培品種のフラボノイド含有量 (成分組成) を明らかにするとともに, 食用キク各栽培品種より調製したポリフェノール画分のラジカル消去活性を測定し, 品種間で比較したので報告する.

1. 実験方法

(1) 食用キク花卉 (分析試料調製)

食用キクは, すべて「JA やまがた」より購入し, 'イワカゼ' は平成 19 年 4 月, 'コトブキ' は平成 19 年 9 月, 'モッテノホカ' (黄色花卉) および 'モッテノホカ' (紫色花卉) は平成 19 年 11 月に, それぞれ山形市内の圃場にて収穫されたものを分析に用いた. 食用キクの成熟度は, 各品種とも, 花卉が開き, 色調, 形状共に食用として最適と判断されたものを使用した. また, 収穫した食用キクは, ガクを除去し, -50℃ にて凍結保存し, 必要量を解凍して各分析に用いた.

(2) HPLC によるポリフェノールの分析

食用キク各栽培品種の凍結花卉重量を正確に測定し (約 5 g), 80% エタノール 100 ml を加え, ホモジナイザーにて粉碎した (約 1 分間). さらに室温 (約 20℃) にて 24 時間静置抽出し, ポリフェノールの抽出を行った. 抽出液は,

〒997-1321 山形県東田川郡三川町大字押切新田字桜木 25

* 〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23

[§] 連絡先 (Corresponding author), sugawarate@pref.yamagata.jp

ろ紙 (5A 版) およびメンブレン (0.45 μ m) にて順次ろ過し, HPLC 分析の試料とした. HPLC 装置は日本分光(株) 製 GULLIVER series 高圧グラディエントシステムを用いた. カラムは Mighty-sil RP-18 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 関東化学) を用い, カラム温度 40 $^{\circ}$ C で分析を行った. 溶出溶媒には溶媒 A (0.05% リン酸-5% アセトニトリル, v/v) および溶媒 B (0.05% リン酸-50% アセトニトリル, v/v) を用いた. 分析は, 溶媒 B を濃度 10% にて 5 分間送液後, 60 分で 40%, 90 分で 80% とする直線濃度勾配で行った. 流速は 1.0 ml/min とし, 成分の検出には多波長検出器 (MD-915, 日本分光) を用い, 各成分の吸収スペクトルを確認するとともに (250~600 nm), 検出波長は 360 nm とした.

フラボノイドの定量に用いた, ルテオリン, アピゲニン, アカセチン, さらにルテオリン 7-O- β -グルコシド, アピゲニン 7-O- β -グルコシドはフナコシから購入し, ルテオリン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシド, アピゲニン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシドおよびアカセチン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシドは, 既報⁵⁾ に従い食用キクから分離・精製したものを使用した. これらフラボノイドを標準試料として検量線を作成し, 絶対検量線法にて求めた 3 回の分析値の平均を定量値とした.

(3) 食用キク各品種のポリフェノール画分調製および主要フラボノイドの DPPH (1, 1-Diphenyl-2-Pyridylhydrazyl) ラジカル消去活性測定

食用キク各栽培品種の凍結花卉 (300 g) に 80% エタノール 1 l を加え, ホモジナイザーにて粉碎を行った (約 1 分間). 次いで 80% エタノール 2 l を追加し, 攪拌後室温にて 24 時間静置し, ポリフェノール成分の抽出を行った. この抽出液を吸引ろ過 (5A 版) し, エタノール除去後 (減圧濃縮), 500 ml のイオン交換樹脂 DIAIONHP-20 (三菱化学製) カラムに供し, さらに 2.5 l の蒸留水にて樹脂の洗浄を

行った. 続いて 1.5 l の 80% エタノールにて, ポリフェノール成分を溶出し, エタノール除去後凍結乾燥した. これを食用キクポリフェノール画分とし, フラボノイド成分を定量するとともに, ラジカル消去活性の評価に用いた.

DPPH ラジカル消去活性の測定は, 試験管にポリフェノール試料 (適量をエタノールに溶解) 0.4 ml と 1.6 ml の 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え, エタノールに溶解した 2.0 ml の 0.5 mM DPPH 溶液を混合, 攪拌し, 室温で 20 分間反応させた. 反応後 517 nm の吸光度を測定した. ポリフェノール試料の代わりにエタノールを用いて同様に測定したときの 517 nm の吸光度をコントロールとした. また, 各種濃度の Trolox 溶液を用いた場合の吸光度を測定し, ラジカル消去活性値は Trolox 相当量 (mmol Trolox 相当量/g ポリフェノール) として示した.

ラジカル消去活性の比較のため, クロロゲン酸, および食用キクの主要なフラボノイドであるルテオリン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシド, アピゲニン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシド, アカセチン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシドを同様に分析に用いた.

2. 実験結果および考察

(1) 食用キク各栽培品種 (花卉) のフラボノイド含有量

図 1 に 'コトブキ' より同定された, 食用キクの主要なフラボノイド, ルテオリン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシド, アピゲニン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシドおよびアカセチン 7-O-(6''-O-マロニル)- β -グルコシドの化学構造を示した. また, 食用キク各栽培品種に含まれるポリフェノールの HPLC クロマトグラムを図 2 に示した. 今回分析に用いた各食用キクにおいては, 栽培品種間でフラボノイド構成が大きく異なることが確認された. 各栽培品種に含まれるフラボノイド含有量およびそのフラボノイド総量に対する割合を表 1 に示した. 各栽培品種に含まれるフラボノイドの特徴として, 'イワカゼ' はアカセチン 7-

図 1 食用キク ('コトブキ') より同定された主要フラボノイド

図 2 食用キク各栽培品種フラボノイドの HPLC クロマトグラム (360 nm)

①: ルテオリン 7-O-グルコシド, ②: アピゲニン 7-O-グルコシド, ③: ルテオリン 7-O-(6''-O-マロニル) グルコシド
 ④: アピゲニン 7-O-(6''-O-マロニル) グルコシド, ⑤: ルテオリン, ⑥: アカセチン 7-O-(6''-O-マロニル) グルコシド
 栽培品種 a: イワカゼ, b: コトブキ, c: モッテノホカ (黄色), d: モッテノホカ (紫色)

表 1 食用キク各品種のフラボノイド含有量[†]

mg/100 g 花卉 (新鮮重量)

成 分	イワカゼ	コトブキ	モッテノホカ (黄色)	モッテノホカ (紫色)
ルテオリン 7-O-グルコシド	n.d. ^{††}	8.92±1.36	7.67±2.74	n.d
アピゲニン 7-O-グルコシド	2.59±0.05	10.1±0.89	6.99±0.67	16.3±2.67
ルテオリン 7-O-(6-マロニル) グルコシド	56.7±1.56	102±1.36	227±3.35	14.8±3.82
アピゲニン 7-O-(6-マロニル) グルコシド	77.1±3.89	156±5.36	208±0.56	350±11.7
ルテオリン	16.7±0.91	7.14±0.39	3.12±1.72	n.d
アカセチン 7-O-(6-マロニル) グルコシド	197±6.48	141±4.41	10.3±1.61	32.1±3.96
計	352.7	425.2	463.1	413.2

[†] 平均±標準偏差 (1 試料について 3 回分析実施)

^{††} HPLC 分析においてピークを確認できなかった成分の定量値を n.d (not detect) と表記した

O-(6''-O-マロニル)-グルコシドの含有量が非常に高く (197 mg/100 g), 'コトブキ' は上記 3 種のマロニル化配糖体の含有量が同程度に高い (102~156 mg/100 g). また, 'モッテノホカ (黄色花卉)' はルテオリン 7-O-(6''-O-マロニル)-グルコシド (227 mg/100 g) およびアピゲニン 7-O-(6''-O-マロニル)-グルコシド (208 mg/100 g) の含有量が高く, さらに 'モッテノホカ (紫色花卉)' はアピゲニン 7-O-(6''-O-マロニル)-グルコシド (350 mg/100 g) 単一に近い成分組成を示した.

植物花卉において, アグリコンと結合した糖を介してマロン酸が結合するポリフェノール (アントシアニン) のマロニル化は, 植物組織内におけるポリフェノールの溶解度を高め, その高濃度蓄積に寄与しているとする報告があ

る⁶⁾. また, 大豆においては, 生合成されたイソフラボンのお大半がグリコシル化さらに糖部分がマロニル化され, イソフラボンの溶解度が増加し, 液胞に大量に蓄積されることが報告されている⁷⁾. 今回分析に用いた食用キクには, ルテオリン, アピゲニン, アカセチンの各配糖体がマロニル化されたフラボノイドが非常に多く含まれており (102~350 mg/100 g), フラボノイドのマロニル化が, 食用キク花卉において, 組織内での高濃度蓄積に寄与している可能性が示唆された.

また, これまで, 食用キクのフラボノイドについて, 動物実験 (マウス) により, 四塩化炭素が誘導する肝機能障害抑制効果について検討し, ルテオリオン, およびルテオリン 7-(6''-O-マロニル)-グルコシドを経口投与した後,

表 2 食用キク各品種ポリフェノール画分のフラボノイド含有量[†]

成 分	g/100 g ポリフェノール画分			
	イワカゼ	コトブキ	モッテノホカ (黄色)	モッテノホカ (紫色)
ルテオリン 7-O-グルコシド	0.91±0.01	1.65±0.14	2.45±0.27	0.37±0.08
アピゲニン 7-O-グルコシド	1.74±0.14	1.99±0.02	1.83±0.04	4.11±0.64
ルテオリン 7-O-(6"-マロニル) グルコシド	12.0±0.72	14.0±0.45	27.0±0.71	2.95±0.52
アピゲニン 7-O-(6"-マロニル) グルコシド	11.1±0.50	19.7±0.94	23.1±0.62	40.1±7.61
ルテオリン	1.69±0.05	0.72±0.04	1.36±0.15	n.d. ^{††}
アカセチン 7-O-(6"-マロニル) グルコシド	21.9±1.07	17.2±0.63	1.20±0.03	2.81±0.51
計	49.3	55.3	56.9	50.3

[†] 平均±標準偏差 (1 試料について 3 回分析実施)

^{††} HPLC 分析においてピークを確認できなかった成分の定量値を n.d. (not detect) と表記した

四塩化炭素により肝障害を誘発した群は、コントロール群 (フラボノイドを投与せず肝障害を誘発したマウス) と比較し、肝障害による血漿の AST (aspartate amino-transferase) および ALT (alanine aminotransferase) 活性の上昇が有意に抑制されることを報告した⁵⁾。また、これらフラボノイドを経口投与したマウスの肝臓過酸化脂質濃度は、コントロール群と比較し、有意に低い値を示したことから、フラボノイドが四塩化炭素により生成するラジカル ($\cdot\text{CCl}_3$) から肝臓を保護している可能性が示唆された⁵⁾。

山形県で栽培される食用キク各栽培品種において、‘モッテノホカ (黄色花弁)’ はルテオリン 7-(6"-O-マロニル)-グルコシドの含有量が非常に高く、本県で栽培される食用キクの中で、特に肝機能の保護・改善に有効である可能性が示唆された。

(2) 食用キク各栽培品種 (ポリフェノール画分) の DPPH ラジカル消去活性

ラジカル消去活性の評価に用いた、各栽培品種ポリフェノール画分のフラボノイド組成 (含有量およびフラボノイド総量に占める割合) を表 2 に示した。表 1 と比較し、ダイアイオン樹脂にて調製したポリフェノール画分の各フラボノイドの成分比は、食用キク花弁とよく一致しており、各栽培品種ポリフェノール画分のフラボノイド含有量は、49.3~56.9 (g/100 g) であった。

各食用キク栽培品種より調製したポリフェノール画分、食用キクの主要なフラボノイド 3 種、およびクロロゲン酸の DPPH ラジカル消去活性を図 3 に示した。その結果、フラボノイド成分ではルテオリン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシドの DPPH ラジカル消去活性が強く、アピゲニン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシド、アカセチン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシドは低い値を示した。さらに各栽培品種ポリフェノール画分において ‘モッテノホカ (黄色花弁)’ のラジカル消去活性が最も強く、‘コトブキ’、‘イワカゼ’、‘モッテノホカ (紫色花弁)’ の順に高い値を示した。ここで、各ポリフェノール画分の、ルテオリン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシド含有量、およびその総フラボノイ

図 3 食用キクの主要なフラボノイドおよび各栽培品種ポリフェノール画分の DPPH ラジカル消去活性

分析値は平均値±標準偏差 (1 試料につき 3 回分析実施) とし、ラジカル消去活性を比較するためクロロゲン酸を同様に分析した

ドに占める存在比は ‘モッテノホカ (黄色花弁)’ (27.0 g/100 g-含有量, 47.5%-総フラボノイドに占める割合), ‘コトブキ’ (14.0 g/100 g, 25.3%), ‘イワカゼ’ (12.0 g/100 g, 24.3%), ‘モッテノホカ (紫色花弁)’ (2.95 g/100 g, 5.86%) であり、ポリフェノール画分のラジカル消去活性は、ルテオリン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシド含有量、および、その総フラボノイドに占める割合に比例して強くなる傾向が認められた。特に食用キク各栽培品種において、ルテオリン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシドの総フラボノイドに占める割合と DPPH ラジカル消去活性の間には非常に高い相関が認められ ($R^2=0.99$), 食用キクポリフェノール画分のラジカル消去活性にはルテオリン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシドが大きく寄与している可能性が強く示唆された。

3. 要 約

山形県にて栽培されている食用キク、4 栽培品種 (イワカゼ, コトブキ, モッテノホカ (黄色花弁), モッテノホカ

(紫色花卉)) について, 主要なフラボノイドを定量するとともに, その成分組成と DPPH ラジカル消去活性との関係を明らかにした.

食用キクのフラボノイド構成は品種により大きく異なっていた. また, ポリフェノール画分のラジカル消去活性はモッテノホカ (黄色花卉) において最も強く, 次いでコトブキ, イワカゼ, モッテノホカ (紫色花卉) における順であった. いずれの食用キクにもルテオリン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシド, アピゲニン 7-O-グルコシド, アピゲニン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシド, アカセチン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシドが含まれていたが, このうち, 最も強いラジカル消去活性を示すルテオリン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシドはモッテノホカ (黄色花卉) において最も含有量が高く, 次いで, コトブキ, イワカゼ, モッテノホカ (紫色花卉) の順で高い値を示した. 一方, ラジカル消去活性の弱いアカセチン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシドおよびアピゲニン 7-O-(6"-O-マロニル)-グルコシド含有量はそれぞれ, イワカゼ, モッテノホカ (紫色花卉) において高い値を示した.

文 献

- 1) 東北農政局山形統計情報事務所, 平成 17~18 年山形農林水産統計年報, 69 (2007).
- 2) 田中孝治, 薬になる植物百科, (主婦と生活社, 東京) pp. 60 (1994).
- 3) Toshihiro, A., Ken, Y. and Yoshimasa, K., Triterpenoids from the flowers of Composite and their anti-inflammatory effects., *Current Topics in Phyto-chemistry.*, **1**, 137-144 (1997).
- 4) Midori, H., Yuexian, X., Yoshimasa, K., Makiko, K. and Hao, W., Scavenging of free radicals and inhibition of lipid peroxidation by extract of Chrysanthemum Petals., *Research Communications in Pharmacology and Toxicology.*, **3**, 147-154 (1998).
- 5) Tetuya, S. and Kiharu, I., Identification of the Major Flavonoids in Petals of Edible Chrysanthemum Flowers and Their Suppressive Effect on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice., *J. Food Sci. Technol. Res.*, "in press".
- 6) 中山 亨, 花色調節技術への期待: アントシアニンアシル基転移酵素の機能と構造, *生物工学*, **86**, 171-173 (2008).
- 7) Barz, W. and Welle, R., Phenolic Metabolism in Plants, eds. Stafford, H and Ibrahim, R, Plenum, 139 (1992).

URL サイト

i) <http://www.yamagata.nmai.org/> (July. 24, 2009)

(平成 21 年 6 月 26 日受付, 平成 21 年 8 月 10 日受理)