アントシアニン色素のスーパーオキシドアニオン消去能の測定

森山洋憲, 森田善彦*, 受田浩之^{*§}, 沢村正義*, 寺原典彦**

高知県工業技術センター

* 高知大学農学部

** 南九州大学健康栄養学部

Superoxide Anion-Scavenging Activity of Anthocyanin Pigments

Hironori Moriyama, Yoshihiko Morita*, Hiroyuki Ukeda^{*§},
Masayoshi Sawamura* and Norihiko Terahara**

Kochi Prefectural Industrial Technology Center, Nunoshida, 3992-3, Kochi 781-5101

*Department of Bioresources Science, Faculty of Agriculture, Kochi University,
Monobe B-200, Nankoku 783-8502**Department of Food Science for Health, Faculty of Health and Nutrition, Minami-Kyushu University,
Kirishima 5-1-2, Miyazaki 880-0032

Superoxide anion-scavenging activity (SOSA) of crude pigments obtained from 18 anthocyanin-containing plants was measured. Electron spin resonance (ESR) and colorimetric method using highly water-soluble tetrazolium salt WST-1 (WST-1 method) were used for measuring SOSA. Consequently, crude pigments from purple pods of pea (*Pisum sativum* L.) and tuber of red potato (*Solanum* spp.) were potent scavengers with >60% inhibition at a level of 0.1 mg/mL. Crude samples extracted from red potato and purple sweet potato (*Ipomoea batatas* cv. Ayamurasaki) also showed high activity (>70% inhibition). In order to find active components, major anthocyanins were prepared from those plants, and then their SOSA were measured. PS1 derived from *P. sativum* L. possessed the most potent activity as shown by SOD equivalent activity of 137 units/mg. In addition, delphinidin- or cyanidin-based anthocyanins showed relatively high SOSA. SOSA of anthocyanins changed by acylation with caffeic acid. It was also observed that the activity of acylated anthocyanins varied depending on the activity of each corresponding deacylated one.

(Received Nov. 18, 2002 ; Accepted Jul. 31, 2003)

食品に含まれる成分はさまざまな生体調節機能を有しており、その機能の一つである活性酸素を消去する作用が注目されている。特に、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と同様の活性、すなわちスーパーオキシドアニオン (O_2^-) を消去できる活性 (以下 SOSA と略記) を有した物質は、老化や生活習慣病の予防に有効な成分として期待されている。そのような活性をもつ成分として、野菜や果物などの植物素材に含まれるポリフェノール類¹⁾²⁾ が挙げられる。

ポリフェノールに属するアントシアニンの生体調節機能についてさまざまな研究が行われている。これまでにアツミカブの主要アントシアニンであるルプロブラッシン (シアニジン 3-*p*-クマロイルソホロシド-5-グルコシド) の動

脈硬化指数低下作用³⁾、インゲンマメに含まれているシアニジン 3-グルコシドのウサギ赤血球膜および肝臓ミクロソーム系における抗酸化作用⁴⁾ が明らかにされている。また紫甘藷アントシアニンの有する α -グルコシダーゼ阻害活性⁵⁾、ブルーベリーアントシアニンの抗酸化作用⁶⁾ などの報告例もある。アントシアニンの有する活性酸素消去能に関する報告もいくつか存在する。ナスに含まれるナスニン (デルフィニジン 3-*p*-クマロイルルチノシド-5-グルコシド)⁷⁾⁸⁾ が高活性物質であることが確認されている。ナスニン以外ではヤマブドウの主要アントシアニンであるマルビン (マルビジン 3, 5-ジグルコシド)、赤キャベツのアントシアニン⁹⁾、そして大麦糠の発酵でできた紫色素 (ホルデミン)¹⁰⁾ などの SOSA を測定した例がある。

アントシアニンは生活習慣病を予防する食品因子として期待されている。その機能を新たな食品の開発に応用するためには、アントシアニンの有する活性酸素消去能について様々な知見が必要である。そこで本研究では各種植物材

〒781-5101 高知県高知市布師田 3992-3

* 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

** 〒880-0032 宮崎県宮崎市霧島 5-1-2

§ 連絡先 (Corresponding author), hukeda@cc.kochi-u.ac.jp

料から抽出したアントシアニンを含む粗色素の SOSA 測定を行い、高活性素材の検索を試みた。さらに、高い SOSA を示す粗色素に含まれる主要アントシアニンの活性測定を行い、構造と活性との関連性について検討した。

実験方法

1. 植物材料

本研究では粗色素の抽出に 18 種類の植物材料を用いた。それら材料の名称、学名、使用部位、入手先、入手年月を表 1 に示す。花卉材料については 45℃ で一晚乾燥後、抽出を行うまで冷暗所に保存した。その他の材料は新鮮なうちに抽出した。

2. 試薬

5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) はラボテック(株)製を、バターミルク由来のキサンチンオキシダーゼ (XOD; EC 1.2.3.2; 0.3 units/mg) はオリエンタル酵母(株)製を、牛赤血球由来の Cu, Zn-SOD (EC 1.15.1.1; 4000 units/mg) は Sigma 社製を用いた。SOD 標品の活性は標準シクロクロム *c* 法¹¹⁾ で得られた unit で表示した。その他使用した試薬は市販の特級品である。

3. HPLC

HPLC は L-6200 インテリジェントポンプシステム(日立)を用いた。分取 HPLC はカラムとして Inertsil ODS (20 mm i.d.×250 mm, GL Science), カラム温度は室温、溶離液として溶媒 A (15% 酢酸, v/v) と溶媒 B (15% 酢酸, 30% アセトニトリル, v/v) を用い、イソクラティックモード (A : B = 70 : 30, v/v), 流速 7.0 ml/min で溶出した。検出は L-4200 UV-VIS 検出器(日立)を用い、波長 520 nm で行った。また、分析 HPLC はカラムとして

Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d.×250 mm, GL Science), カラム温度を 30℃ とし、溶離液は溶媒 A (1.5% リン酸, v/v) と溶媒 B (1.5% リン酸, 20% 酢酸, 25% アセトニトリル, v/v) を用い、グラジエント条件 (溶媒 B, 25%→55%, 60 分間) で設定し、流速 1.0 ml/min で溶出した。検出は PDA 多波長検出器 (200–650 nm, MD-1510, 日本分光(株)) を用い、520, 310, 280 nm の各波長で検出した。

4. 粗色素の調製

乾燥花卉 (約 25 g) あるいは新鮮な植物材料の適当量を 1 l の 15% 酢酸溶液に一晚浸漬して抽出した。抽出物を Amberlite XAD-2000 カラム (オルガノ(株), φ45×300 mm) に吸着・水洗後、5% の酢酸を含む 70% エタノール溶液により溶出した。色素溶出液を減圧濃縮後、残渣を 50% 酢酸を含むメタノール溶液に溶解した。この溶液を遠心分離後、上清に過剰のジエチルエーテルを 3 回添加し、沈殿物を得た。この沈殿物を減圧乾燥して粗色素試料とした。得られた粗色素の収率は、各植物の乾燥重量当たり 0.05~1% であった。

5. アントシアニンの調製

粗色素 (約 5 g) を 0.5% トリフルオロ酢酸約 50 ml に溶解し、遠心分離した後に上清をポリクラール VT カラム (和光純薬(株), φ45×15 mm) にかけて、0.5% トリフルオロ酢酸 : エタノール = 70 : 30 (v/v) で溶出し、色素バンドごとに分画した。

各フラクションを減圧濃縮し、残渣を 15% 酢酸のメタノール溶液に溶解した。遠心分離後、上清をシリンジフィルター (アドバンテック, DISMIC-13JP, 0.2 μm) に通し、分取 HPLC で単離・精製した。また、得られた各色素フラクションは分析 HPLC で純度の検定を行った。純度の高

表 1 植物材料

植物材料名	学名	品種名	英名	使用部位	入手(栽培)先	入手年月
赤ジャガイモ	<i>Solanum</i> spp.	Inca Red	Potato	塊茎	北海道農試	2000 年 12 月
紫ジャガイモ	<i>Solanum</i> spp.	Inca Purple	Potato	塊茎	"	2000 年 12 月
紫ヤマイモ	<i>Dioscorea alata</i> L.		Yam	塊茎	南九州大学農場	2000 年 7 月
紫甘藷	<i>Ipomoea batatas</i> L.	Ayamurasaki	Sweet potato	塊根	九州農試	2001 年 11 月
紫甘藷	<i>Ipomoea batatas</i> L.	Ayamurasaki	Sweet potato	塊根カルス	"	2000 年 6, 7 月
デイゴ	<i>Erythrina variegata</i> L.			花卉	南九州大学農場	2001 年 6 月
赤アサガオ	<i>Pharbitis nil</i> L.	Scarlet O'Hara	Morning glory	花卉	"	2001 年 7, 9 月
イリオモテアサガオ	<i>Ipomoea indica</i> L.		Morning glory	花卉	"	2001 年 8, 11 月
チョウマメ	<i>Clitoria ternatea</i> L.		Butterfly pea	花卉	"	2001 年 7, 10 月
エルダーベリー	<i>Sambucus nigra</i> L.		Elderberry	果実	三栄源エフエフアイ(株) (色素製剤)	1999 年 8 月
ブドウ	<i>Vitis vinifera</i> L.		Grape	果皮	市販品(宮崎県)	1999 年 8 月
ブルーベリー	<i>Vaccinium</i> spp.		Blueberry	果皮	" (熊本県)	1999 年 7 月
紫トウモロコシ	<i>Zea mays</i> L.		Corn	果皮	三栄源エフエフアイ(株) (色素製剤)	2000 年 5 月
エンドウ	<i>Pisum sativum</i> L.		Pea	サヤ	南九州大学農場	2000 年 5 月
ムラサキゴデン	<i>Setcreasea pallida</i> L.		Purple heart	葉	"	2001 年 7, 9 月
紫シソ	<i>Perilla ocimoides</i> L.		Perilla	葉	"	2000 年 7, 9 月
紫キャベツ	<i>Brassica oleracea</i> L.		Cabbage	葉	"	2000 年 12 月
赤ダイコン	<i>Raphanus sativus</i> L.		Radish	根	三栄源エフエフアイ(株) (色素製剤)	2000 年 5 月

い (HPLC ピーク面積比 95% 以上) アントシアニン画分について減圧濃縮後, 残渣を最小量のトリフルオロ酢酸で溶解し, 過剰のジエチルエーテルを加えて沈殿させた. 沈殿物をシリカゲルデシケータ中で一夜減圧乾燥し, アントシアニンのトリフルオロ酢酸塩を得た.

6. 色素の質量分析による同定法

単離したアントシアニン色素は 1% 酢酸-50% アセトニトリルに溶かし, エレクトロスプレーイオン化時間飛行型質量分析計 (Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry : ESI-TOFMS, Mariner Workstation system (Applied Biosystems Co., Ltd. USA)) にかけ, 陽イオンモードで測定した. 各色素の分子イオンピーク m/z $[M]^+$ はノズル電圧 100 V で, またアグリコンのフラグメントイオンはノズル電圧 200 V で測定し, 確認した.

7. SOSA 測定

電子スピン共鳴 (ESR) 法, ならびに新規水可溶性テトラゾリウム塩 WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate sodium salt) を用いた発色法 (WST-1 法) による SOSA の測定は, 既報¹²⁾ に従って行った. 粗色素の有する SOSA 測定結果は, 各試料を 0.1 mg/ml に調製した際の阻害率で示した. 単離したアントシアニンの SOSA を測定する場合, ESR 法では 0.1 mg/ml, WST-1 法では 0.01 mg/ml に試料を調製した. 各試料の調製には, 蒸留水を Auto Pure WQ501 (Millipore 社製) に通して処理した超純水を用いた. 試料は超純水で調製後, 直ちに SOSA 測定に供した. それぞれの結果は, 3 回の測定平均値 $\pm$ 標準偏差として表示した.

実験結果と考察

1. 粗色素の有する SOSA

粗色素試料に含まれているアントシアニン以外の成分はエーテル洗浄操作でかなり除かれたと考えた. 予めこのことを確認するために, 少量の各粗色素粉末を 15% 酢酸に溶解したものと, 各植物材料を 15% 酢酸で抽出した直後の溶液の両方を波長 310 nm 検出で HPLC 分析した. 各粗色素の組成は抽出した後の溶液のものと比べると, アントシアニンのピークに対するポリフェノール成分と予想される紫外外部吸収物質のピークの割合が相対的に大きく減少していた.

粗色素試料の主要成分がアントシアニンであることを確認後, その試料の有する SOSA を ESR 法および WST-1 法により測定した (表 2). 0.1 mg/ml に調製した各試料を ESR 法で測定したところ, 31.2~68.0% の阻害率が得られた. エンドウサヤ粗色素と赤ジャガイモ塊茎粗色素は ESR 法で 60% 以上の高い阻害率を示した. それらに次いで 50% 以上の値を示したのはムラサキゴテン葉, 紫甘藷塊根, デイゴ花卉, 紫シソ葉, 赤アサガオ花卉, 紫ジャガイモ塊茎からの粗色素であった.

0.1 mg/ml に調製した各試料を WST-1 法で測定した結果, 10.4~78.3% の値が得られた. 赤ジャガイモ塊茎, 紫甘藷塊根, 紫ジャガイモ塊茎からの各粗色素は, WST-1 法で 70% 以上の高い阻害率を示した. それらに次いで 60% 以上の高い値を示した試料はムラサキゴテン葉, 紫シソ葉からの粗色素であった.

チョウマメ花卉および紫キャベツ葉の粗色素は, ESR 法と WST-1 法の両法でともに低い活性を示した. デイゴ花卉, 紫トウモロコシ種皮, 赤ダイコン根からの粗色素は一方の測定方法では 50% 以上の高い阻害率を示しながらも, もう一方の方法では相対的に低い活性しか得られなかった.

受田らは ESR 法で IC_{50} を示す SOD 活性を 4.4 units/ml と報告¹²⁾ している. 表 2 に示す試料の中で赤アサガオ花卉と紫ジャガイモ塊茎の粗色素が 0.1 mg/ml で IC_{50} に近似しているので, これら試料の SOD 等価活性は約 40 000 units/g となる. この値は受田らの報告¹²⁾ による緑茶の活性 (67 100, 113 000 units/g) とコーヒーの活性 (31 800 units/g) との間に位置する. したがって, 赤アサガオ花卉と紫ジャガイモ塊茎の粗色素, そしてこれらより高い活性を示すエンドウサヤ, 赤ジャガイモ塊茎, ムラサキゴテン葉, 紫甘藷塊根, デイゴ花卉, 紫シソ葉の粗色素は, 嗜好飲料と同等の高い SOSA を有することが確認された.

粗色素試料を ESR 法で測定した結果と WST-1 法で得られた結果との間には直線的な相関 ($r=0.661$, $p>0.01$) が認められたものの, ESR 法と WST-1 法のどちらか一方で高い SOSA を示す試料がいくつか存在した. そのような試料には, 粗色素試料に共存する高水溶性成分などの影

表 2 粗色素試料の有する SOSA

試料 (0.1 mg/ml)	ESR 法 (%)	WST-1 法 (%)
エンドウサヤ	68.0 $\pm$ 1.5	55.6 $\pm$ 4.5
赤ジャガイモ塊茎	61.0 $\pm$ 1.6	78.3 $\pm$ 2.8
ムラサキゴテン葉	59.2 $\pm$ 1.0	69.9 $\pm$ 5.1
紫甘藷塊根	59.0 $\pm$ 0.5	77.0 $\pm$ 1.4
デイゴ花卉	57.2 $\pm$ 1.7	30.4 $\pm$ 4.6
紫シソ葉	54.3 $\pm$ 2.2	67.1 $\pm$ 4.3
赤アサガオ花卉	51.6 $\pm$ 2.9	49.0 $\pm$ 3.9
紫ジャガイモ塊茎	51.0 $\pm$ 1.8	75.1 $\pm$ 1.6
エルダーベリー果実	48.0 $\pm$ 1.4	39.6 $\pm$ 4.2
イリオモテアサガオ花卉	47.9 $\pm$ 1.7	49.6 $\pm$ 2.6
ブドウ果皮	44.8 $\pm$ 0.5	45.4 $\pm$ 6.5
紫ヤムイモ塊茎	43.2 $\pm$ 1.6	27.1 $\pm$ 2.6
ブルーベリー果皮	41.1 $\pm$ 1.9	53.6 $\pm$ 2.9
紫トウモロコシ種皮	40.7 $\pm$ 1.9	59.4 $\pm$ 1.3
紫甘藷塊根カルス	39.2 $\pm$ 4.1	24.5 $\pm$ 1.6
赤ダイコン根	37.3 $\pm$ 5.1	52.3 $\pm$ 3.9
チョウマメ花卉	31.8 $\pm$ 0.5	10.4 $\pm$ 2.8
紫キャベツ葉	31.2 $\pm$ 2.1	19.0 $\pm$ 5.5

阻害率は 3 回の平均値 $\pm$ 標準偏差で表した.

響についてさらに十分な検討が必要になると考えた。そこで本研究では、用いた2つの測定法でともに高い阻害率を示した植物材料に着目し、その材料の主要アントシアニンの有する SOSA の評価を試みた。両方法で 50% 以上の値を示した紫甘藷塊根、紫ジャガイモ塊茎、紫シソ葉、エンドウサヤの6つの試料、さらに参考試料としてイリオモテアサガオ花卉と赤アサガオ花卉からの単離アントシアニンを加え、以上7つの素材に含まれる主要色素の活性測定を行った。

2. アントシアニンの有する SOSA

SOSA 測定に供したアントシアニンの構造を図1に示す。エンドウサヤ色素 (PS1, PS6)¹³⁾、紫甘藷塊根色素 (YGM-3, YGM-5b, YGM-6)¹⁴⁾¹⁵⁾ および赤アサガオ花卉色素 (SOA-4, SOA-6)⁵⁾ は以前に単離・構造決定したものをを用いた。また、紫ジャガイモ塊茎からのペタニン¹⁶⁾¹⁷⁾、紫シソ葉からのシソニンとマロニルシソニン¹⁸⁾ およびイリオモテアサガオ花卉からのヘブンリーブルーアントシアニン (MPN14)¹⁹⁾ については、ESI-TOFMS 測定により分子量を確認したものをを用いた (表3)。

図2にアントシアニンの有する SOSA を ESR 法により測定した結果を表示した。測定濃度は粗色素のときと同じ 0.1 mg/ml に合わせた。エンドウサヤ由来の色素 PS1 と

PS6 はそれぞれ 72.7% と 69.3% の SOSA 値を示した。各 SOSA 値は粗色素 (68.0%) と同等の活性を示していることから、両物質はともに活性に寄与する成分と考えられた。

紫甘藷塊根からの3つの主要アントシアニン、すなわち YGM-5b は 53.9%, YGM-6 は 48.4%, YGM-3 は 46.1% の活性をそれぞれ示した。それら物質の中では YGM-5b が最も高い阻害率を示し、粗色素の活性 (59.0%) とも近似している。したがって YGM-5b が紫甘藷塊根の主要な活性成分と考えられた。しかしながら YGM-3 と YGM-6 も比較的高い SOSA を有することから、両物質ともに活性に寄与する成分と予想される。

紫シソ葉の主要色素であるシソニンとマロニルシソニンの各 SOSA (53.6% と 42.8%) を粗色素の値 (54.3%) と比較した。その結果、マロニルシソニンに比べてシソニンの方が粗色素の活性により強く影響する物質であると考えられた。

紫ジャガイモ塊茎からのペタニンを測定した結果、58.9% の阻害率が得られた。この値は粗色素の阻害率 (51.0%) とも近似していることから、紫ジャガイモ塊茎の主な活性成分はペタニンであると推察した。

イリオモテアサガオ花卉からの MPN14 は 14.9% の

図 1 主要アントシアニンの構造

SOSA 値を示し、粗色素の値 47.9% よりも低いことがわかった。赤アサガオ花弁由来の SOA-4 と SOA-6 はそれぞれ 39.0% と 19.6% の阻害活性を示した。SOA-6 よりも SOA-4 の有する SOSA の方が粗色素の活性 (51.6%) に近いことが明らかとなった。

3. アントシアニンの構造と活性

ESR 法では粗色素と主要アントシアニンをともに 0.1 mg/ml で測定できたことから両試料の活性を比較できた。WST-1 法においても同じく 0.1 mg/ml に調製した主要アントシアニンを測定に供した。まず初めに O_2^- を介さない試料による直接的な WST-1 の還元を知るために、XOD を添加しない反応系における試料の吸光度変化 (Ab) を測定し、試料の代わりに水を添加した際の吸光度変化 (Ac) と比較した。試料による非特異的な妨害反応の程度として Ac に対する Ab の割合を求めたところ、PS6 は 45.8%, PS1 は 33.8%, YGM-5b は 21.1%, ペタニンは 12.4% の妨害が観察された。これら妨害の程度は、既報¹²⁾

で測定に問題ないレベルと見なしている 10% を越えていることから、さらに試料を希釈する必要があった。そこで 0.01 mg/ml に主要色素を調製してそれぞれの妨害を調べたところ、すべて 8.5% 以下にすることができ、この濃度で WST-1 法による SOSA を測定した。その結果、それらの主要アントシアニンは 2.3~34.1% の SOSA を示した。WST-1 法で得られた SOSA 活性を ESR 法で得られた値に対してプロットしたところ (図 3)、両者の相関は極めて低いことが明らかとなった ($r=0.390$, $n=11$)。この結果は両者の方法で用いた試料濃度が異なること、さらに両者のアッセイ pH が大きく異なることに起因するものと考えられた。特に WST-1 法では pH 10.2 を使用していることから、アントシアニンの安定性に対する影響も無視し得ない。ところが、一見低い相関しか見られなかった両者のプロットをアントシアニンのコーヒー酸の有無によって分類したところ、両者の測定値の間には、コーヒー酸をもつアシル化アントシアニン類で $r=0.865$ ($n=6$)、コーヒー酸をもたないグループで $r=0.996$ ($n=5$) の高い直線的な相関が成立していた。図 3 の二本の直線を比較すると、コーヒー酸を持たないグループは ESR 法では相対的に高い SOSA を示すが、WST-1 法では低い活性しか示さないことが判明した。逆に、コーヒー酸を持つグループは WST-1 法で相対的に高い活性を有していた。しかもこのグループの回帰直線は、グラフの原点近傍を通ることも明らかとなった。

前にも述べたように、ここで用いた両者のアッセイ pH は大きく異なっている (ESR 法: pH 7.4, WST-1 法: pH

表 3 単離色素の ESI-TOFMS データ

色 素 名	質量電荷比 (m/z)		
	分子イオン ピーク [M] ⁺	アグリコンの フラグメントイオン	既知 分子量
ペタニン	933	317 (ペチュニジン)	933
シソニン	757	287 (シアニジン)	757
マロニルシソニン	843	287 (シアニジン)	843
MPN14	1759	301 (ペオニジン)	1759

図 2 ESR 法により測定したアントシアニンの SOSA

0.1 mg/ml に調製した試料を測定に供した。各植物材料に由来する粗色素の値と主要アントシアニンの値を並べて表示した。阻害率は 3 回の平均値 ± 標準偏差で表した。

10.2). したがって、ここで見られた 2 種類の相関は、アントシアニンの pH 安定性が SOSA に深く関与していることを示唆する。さらに、それぞれのグループがコーヒー酸の有無で分類されることから、アントシアニンが有する SOSA の pH 依存性にコーヒー酸の寄与が大きいことが明らかとなった。コーヒー酸を有するアントシアニンが示した WST-1 法での高い活性が、アントシアニンの構造そのものに起因するのか、あるいは pH で変化した 2 次的な構造体によるのかを今後さらに検討していく必要がある。

次に、WST-1 法よりも pH が中性に近い ESR 法で得られた測定結果を用いて、アントシアニンの構造と活性との相関を求めた。まずアグリコンの構造に注目すると、デルフィニジン、ペチュニジンおよびシアニジン骨格（いずれも B-環にカテコール構造を持つ）を基本とするアントシアニン類がペラルゴニジンあるいはペオニジン骨格（いずれも B-環にカテコール構造を持たない）のアシル化アントシアニンよりも相対的に高い活性を示していた。

PS1 および PS6 が特に高い活性物質であることから、両物質に共通する骨格のデルフィニジンに着目した。アントシアニンの有する SOSA は B 環の水酸基の数に依存しており、水酸基の数が増加するに従い強くなることが Tsuda らにより報告されている²⁰⁾。この報告と同様に、本研究においても B 環に水酸基を 3 個もつデルフィニジンが、水酸基を 1~2 個もつ他のアントシアニンと比較して高い SOSA を示していた。一方、デルフィニジン 3-ルチノシド-5-グルコシドが *p*-クマル酸でアシル化された色素としてナスニンが知られている⁷⁾。ナスニンの SOSA は

Kaneyuki らによって報告⁸⁾されており、0.1 mg/ml で約 80% の阻害率を示すことが確認されている。この阻害率は PS1 より約 10% 高いが、本研究結果と矛盾することなくデルフィニジン類が高活性物質であることを支持するものである。続いて、詳細に PS1 の活性を検討するために IC₅₀ を解析したところ 0.032 mg/ml の値が得られた。この値を SOD 等価活性に換算すると 137 units/mg であり、PS1 の SOSA がナスニンの活性 (148 units/mg) に匹敵することが明示された。ナスニンの SOSA が PS1 より高いことは、Igarashi らがナスニンの抗酸化活性にアシル基の強い関与を指摘²¹⁾しているのと同様に、SOSA に対してもアシル基の増強作用があることが考えられる。そこで、アシル化の活性への影響を調べるために、脱アシル化したアントシアニンの SOSA を測定した。測定した物質は 3 つのアントシアニン、すなわち YGM-3 の基本構造である Cy3S5G (シアニジン 3-ソホロシド-5-グルコシド)、YGM-5b、YGM-6 および MPN14 に共通する構造の Pn3S5G (ペオニジン 3-ソホロシド-5-グルコシド)、SOA-4 と SOA-6 に共通する Pg3S5G (ペラルゴニジン 3-ソホロシド-5-グルコシド) である。ESR 法により Cy3S5G を測定したところ、0.1 mg/ml に調製した試料は 45.8% の阻害率を示した。この値と比較すると、Cy3S5G にコーヒー酸が結合した YGM-3 (47.7%) の値は近似していた。次に Pn3S5G の測定を行ったところ、18.2% の阻害率が得られた。この値と比較すると、Pn3S5G のアシル化物 YGM-5b (53.9%) と YGM-6 (48.4%) の値は高かったが、MPN14 (14.9%) の値は同等であった。さらに Pg3S5G を測定した結果、19.1% の値が得られた。この値に比べて Pg3S5G のアシル化物 SOA-4 (39.0%) の値は高く、SOA-6 (19.6%) の値は同等であった。これらの結果から、ペラルゴニジンあるいはペオニジンを骨格とするアントシアニンでは、コーヒー酸が結合することにより活性が増大する傾向にあることが明らかとなった。一方、シアニジンのようにアグリコンの活性が高い場合、必ずしもアシル化によって活性が増大しないことが示唆された。

MPN14 の場合、アシル化によってむしろ活性が低下していた。その物質は基本骨格となる Pn3S5G にコーヒー酸を 3 個と糖分子を 3 個結合したものであり、他のアントシアニンよりも大きな分子構造を有している。したがって MPN14 に関して、活性に対するアシル化の影響は、それより低分子量の物質に対するものとは異なった傾向を示したものと推察された²²⁾。

要 約

アントシアニンを特徴とする植物材料に着目し、ESR 法あるいは WST-1 法により SOSA の測定を行ったところ、イモ類、シソ葉、エンドウサヤからの粗色素などが高い活性を示した。それら植物の主要アントシアニン色素の

図 3 ESR 法と WST-1 法で得られた主要アントシアニンの SOSA

○, コーヒー酸をもつアシル化アントシアニン; □, コーヒー酸をもたないアントシアニン; 1, ペタニン; 2, YGM-3; 3, YGM-5b; 4, YGM-6; 5, マロニルシソニン; 6, シソニン; 7, PS1; 8, PS6; 9, MPN14; 10, SOA-4; 11, SOA-6.

SOSA をさらに測定した。その結果、エンドウサヤ、紫甘藷塊根、紫シソ葉、紫ジャガイモ塊茎からのアントシアニンが高い SOSA を示した。また、デルフィニジンおよびシアニジン骨格をもつ色素類の有する活性が高いことも観察された。アントシアニンの活性はコーヒー酸によるアシル化によって変化することも明らかとなった。アシル化に伴う活性の増減は、脱アシル化色素類の有する活性の高低によって異なっていた。

植物材料を供与下さいました独立行政法人九州沖縄農業研究センター・畑作研究部長山川 理博士、独立行政法人北海道農業研究センター・畑作研究部ばれいしょ育種研究室室長の森 元幸博士および和田製糖(株) 開発部研究室林 一也博士に感謝致します。

文 献

- 1) Yokozawa, T., Nakagawa, T. and Kitani, K., Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3549-3552 (2002).
- 2) Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Teissedre, P.L., Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 890-894 (1995).
- 3) Igarashi, K., Abe S. and Satoh, J., Effects of atsumi-kabu (Red Turnip, *Brassica campestris* L.) anthocyanin on serum cholesterol levels in cholesterol-fed rats. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 171-175 (1990).
- 4) Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S.-W., Kawakishi, S. and Osawa, T., Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2407-2410 (1994).
- 5) Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N. and Matsumoto, K., α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. α -Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1952-1956 (2001).
- 6) Kalt, W., Ryan, D.A.J., Duy, J.C., Prior, R.L., Ehlenfeldt, M.K. and Kloet, S.P.V., Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4761-4767 (2001).
- 7) Watanabe, S., Sakamura, S. and Obata, Y., The structures of acylated anthocyanins in eggplant and perilla and the position of acylation. *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 420-422 (1966).
- 8) Kaneyuki, T., Noda, T., Traber, M.G., Mori, A. and Packer, L., Superoxide anion and hydroxyl radical scavenging activities of vegetable extracts measured using electron spin resonance, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **47**, 979-989 (1999).
- 9) 五十嵐喜治, 食品素材成分としてのアントシアニンの生理機能, *Foods and Food Ingredients J. of Japan*, **187**, 17-29 (2000).
- 10) Deguchi, T., Ohba, R. and Ueda, S., Radical scavenging activity of a purple pigment, hordeumin, from uncooked barely bran-fermented broth. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3198-3201 (2000).
- 11) Beauchamp, C. and Fridovich, I., Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287 (1971).
- 12) 受田浩之, 森山洋憲, 川名大介, 片山泰幸, 中林錦一, 沢村正義, スーパーオキシドアニオン消去活性新規測定法の食品への応用, *食科工*, **49**, 25-31 (2002).
- 13) Terahara, N., Honda, T., Hayashi, M. and Ishimaru, K., New anthocyanins from purple pods of pea (*Pisum* spp.). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 2569-2574 (2000).
- 14) Terahara, N., Shimizu, T., Kato, Y., Nakamura, M., Maitani, T., Yamaguchi, M. and Goda, Y., Six diacylated anthocyanins from the storage roots of purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1420-1424 (1999).
- 15) Goda, Y., Shimizu, T., Kato, Y., Nakamura, M., Maitani, T., Yamada, T., Terahara, N. and Yamaguchi, M., Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. *Phytochemistry*, **44**, 183-186 (1997).
- 16) 石井現相, 森 元幸, 梅村芳樹, 瀧川重信, 田原哲士, 赤紫肉色ジャガイモ塊茎のアントシアニンとその含量, *食科工*, **43**, 887-895 (1996).
- 17) Andersen, O.M., Opheim, S., Aksnes, D.W. and Froystein, N.A., Structure of petanin, an acylated anthocyanin isolated from *Solanum tuberosum*, using homo-nuclear and hetero-nuclear 2-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochem. Anal.*, **2**, 230-236 (1991).
- 18) Goto, T., Takase, S. and Kondo, T., PMR spectra of natural acylated anthocyanins determination of stereostructure of awobanin, shisonin and violanin. *Tetrahedron Lett.*, **19**, 2413-2416 (1978).
- 19) Kondo, T., Kawai, T., Tamura, H. and Goto, T., Structure determination of Heavenly Blue anthocyanin, A complex monomeric anthocyanin from the morning glory *Ipomoea tricolor*, by means of the negative NOE method. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 2273-2276 (1987).
- 20) Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T., Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L.. *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 1033-1039 (1996).
- 21) Igarashi, K., Yoshida, T. and Suzuki, E., Antioxidative activity of nasunin in chouja-nasu (little eggplant, *Solanum melongena* L. 'chouja'). *日食工誌*, **40**, 138-143 (1993).
- 22) 大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井亜紀夫, アントシアニン—食品の色と健康—, pp. 124-135, 建帛社, 東京 (2000).

(平成 14 年 11 月 18 日受付, 平成 15 年 7 月 31 日受理)