

研究ノート

品種および収穫時期の違いがパプリカの抗酸化能に及ぼす影響

若木 学*, 石川(高野) 祐子

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

**Effects of variety and harvest season on antioxidant activities of paprika
(*Capsicum annuum* L.).**

Manabu Wakagi, Yuko Takano-Ishikawa

Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

Paprika (*Capsicum annuum* L.) has various antioxidants such as tocopherol, carotenoids and flavonoids. In this study, we evaluated antioxidant capacities of five varieties of paprika with different color and harvest season by singlet oxygen absorption capacity (SOAC) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) methods. The SOAC values of red paprika were same as that of orange paprika and higher than these of yellow paprika. On the other hand, this tendency was not observed in ORAC values of paprika. The antioxidant capacities of ‘Ferrari’, red paprika, were affected by harvest season, whereas the other varieties were not affected.

緒言

近年、紫外線の増加や大気汚染、喫煙、精神的ストレスなどにより、生体内での活性酸素種のバランスが崩れ、過剰な活性酸素種が生体内のタンパク質や脂質、あるいはDNAなどの高分子と反応してタンパク質の変

性や過酸化脂質の生成、遺伝子障害を起こすことにより、生活習慣病の発症や老化の促進をもたらすと考えられている¹⁾。そのため、生体に備わったスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼのような活性酸素種を除去する機構に加え、食事由来の抗酸化物質の摂取が健康維持に重要といえる。

食品成分の抗酸化作用機構には、直接的に活性酸素

* 連絡先 (Corresponding author), mana5998bu@affrc.go.jp

種を消去する作用と生体内における酸化ストレス防御関連遺伝子群の発現誘導を行うことで間接的に活性酸素種を消去する作用の二つが期待される。そのうち、食品成分による直接的な活性酸素種消去作用は、フリーラジカル捕捉と一重項酸素消去に分けられる。フリーラジカル捕捉能を測定するOxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 法は、1992年に米国農務省 (USDA) のPriorらにより開発され、渡辺らにより測定方法に改良が加えられ、分析精度の向上、および妥当性確認が行われた^{2,3)}。一方、一重項酸素消去能を測定する方法としては、大内ら⁴⁾によってSinglet Oxygen Absorbance Capacity (SOAC) 法が開発された。これにより一重項酸素消去能を有するカロテノイド類の抗酸化能評価が可能となった。

SOAC法は、抗酸化物質とUV-Visプローブである1,3-ジフェニルイソベンゾフラン (DPBF) との共存下でエンドペルオキシド (EP) の熱分解 (35°C) により一重項酸素を生成させ、競争反応によって減衰するDPBF (極大吸収波長413 nm) の吸光度を経時的に測定することで抗酸化物質の一重項酸素消去能を測定する方法である。DPBFの時間変化は、 $[DPBF] = [DPBF \text{ 初期値}] e^{-kt}$ (一次反応) で表すことができる。DPBFの時間変化は、被験試料の一重項酸素除去能によって異なることから、その減衰速度の違いを標準物質として α -トコフェロールを用いて相対的に評価するものである。近年、24穴プレートで測定できるように改良されたことにより、従来法に比べて多くの検体を測定することが可能となった⁵⁾。

ORAC法は、抗酸化物質と蛍光プローブであるフルオレセインとの共存下でラジカル発生剤2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) の熱分解 (37°C) によりペルオキシラジカルを発生させ、このラジカルにより分解されるフルオレセインの蛍光強度を経時的に測定し、抗酸化物質がラジカルを消去し、フルオレセインの分解を抑制する能力をTrolox[®]当量として算出する方法である²⁾。ORACには、親水性の化合物の抗酸化能を評価するhydrophilic-ORAC (H-ORAC) 法と、親油性の化合物を評価するlipophilic-ORAC (L-ORAC) 法がある。H-ORAC法は、アセトン：水：酢酸=70:29.5:0.5の組成からなるAWA溶液で抽出される親水性画分を測定する方法で、ポリフェノール類やアスコルビン酸などが測定される²⁾。一方L-ORAC法は、ヘキサン：ジクロロメタン=1:1で抽出される親油性画分を測定する方法で、メチル- β -サイクロデキストリンを溶解促進剤として使用することにより脂溶性ビタ

ミンであるトコフェロールなどの水に溶けにくい成分も水溶性の反応系で測定することができる³⁾。

パプリカ (*Capsium annuum* L.) は赤、黄、または橙など様々な色の果肉を持つナス科トウガラシ属の植物であり、それぞれの品種において特徴的な成分組成をしていることが報告されている⁶⁾。本研究では、パプリカの抗酸化能をSOAC法およびORAC法を用いて評価し、品種および収穫時期による違いを検討することを目的とした。その結果、品種によって抗酸化能、特に一重項酸素消去能が異なることを見出したので報告する。

実験材料及び方法

1. 試料

パプリカ5品種 (赤肉種：'サッポロ'、'フェラーリ'、黄肉種：'ヘルシンキ'、'コレッティ'、橙肉種：'グローリー') を対象に、2014年9月から12月の間、宮城県栗原市にある株式会社ベジ・ドリーム栗原のビニールハウス内で生産された適熟果を毎月購入した。パプリカ5果を1群とし、可食部を縦に4分割し、対角上の2片を1~2 cm角に裁断してよく混合し、200 g程度を取り測定試料とし、3群 (反復) の処理を行った。それぞれの試料を液体窒素で速やかに凍結した後、凍結乾燥 (真空凍結乾燥機FD-20BU/SK01; 日本テクノサービス株式会社) を行った。凍結乾燥後、グラインドミックス (GM-200; Retsch社) により約300 μ m粒度まで粉碎し、アルミパウチ袋に入れ、実験に使用するまで遮光密閉状態で-30°Cで保存した。

測定に用いた試薬類は、ジクロロメタン (ナカライテスク)、 α -トコフェロール・EP・DPBF・クロロホルム・エタノール・重水・メタノール・n-ヘキサン・アセトン・酢酸・AAPH・リン酸水素二カリウム・リン酸二水素カリウム・ジメチルスルホキシド (DMSO, 以上和光純薬)、メチル- β -サイクロデキストリン (純正化学)、フルオレセインナトリウム塩、(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox[®], 以上Sigma-Aldrich) であり、すべて特級相当のグレードのものを用いた。

2. SOAC法によるパプリカの抗酸化能評価

パプリカ凍結乾燥粉末約0.5 gを精秤し、メタノール洗浄済みの海砂約5 gと混合した後、高速溶媒抽出装置 (ASE-350:Dionex) を用いて、SOAC法測定溶媒 (クロロホルム：エタノール：重水=50:50:1) で抽出し

た（抽出条件：溶媒を抽入して70℃、5分間静置後、10.3 MPaの圧力で60秒間パージを4回繰り返す）。得られた抽出液はSOAC法測定溶媒で50 mLに定量した。SOAC法測定は、高橋らの論文⁵⁾に記載されている方法に従って行った。測定には蓋付き24穴マルチプレート〔特注品（実用新案登録第3199828号）、ZERO〕を用い、413 nmの吸光度の経時変化をVient XS (DSファーマバイオメディカル)を用いて測定した。SOAC値は新鮮重量1 gあたりの α -トコフェロール相当量 ($\mu\text{mol TE/g FW}$)として示した。

3. ORAC法によるパプリカの抗酸化能評価

ORAC測定は、渡辺らの方法^{2,3)}に従って行った。パプリカ凍結乾燥粉末約1 gを精秤し、海砂と混合した後、高速溶媒抽出装置を用いて、n-ヘキサシロタン：ジクロロメタン (1:1)により抽出される親油性画分を得た（抽出条件：溶媒を抽入して70℃、5分間静置後、10.3 MPaの圧力で60秒間パージを4回繰り返す）^{2,3)}。その後、引き続きMWA溶媒（メタノール：水：酢酸=90:9.5:0.5）を用いて抽出し（抽出条件：溶媒を抽入して80℃、5分間静置後、10.3 MPaの圧力で60秒間パージを4回繰り返す）、親水性画分を得た。なお、親油性画分は窒素気流下で乾固、親水性画分はMWA溶媒で50 mLに定容した後、それぞれ測定まで-80℃で保存した。

L-ORAC測定：親油性画分はDMSO (5 mL)で再溶解した後、7% (w/v)メチル- β -サイクロデキストリンを含む50%アセトン溶液で適宜希釈し、渡辺らの方法³⁾に従ってL-ORAC値を測定した。測定には96穴マイクロプレート (Falcon; #3072)を用い、蛍光強度の経時変化 (0~120min)をPowerscan HT (大日本ファーマメディカル)を用いて測定した。L-ORAC値は新鮮重量100 gあたりのTrolox相当量 ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g FW}$)として示した。

H-ORAC測定：親水性画分は、75 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4)を用いて適宜希釈し、渡辺らの論文²⁾に記載されている方法に従ってH-ORAC値を測定した。測定には96穴マイクロプレート (Falcon)を用い、蛍光強度の経時変化 (0~90min)をPowerscan HTを用いて測定した。H-ORAC値は新鮮重量100 gあたりのTrolox相当量 ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g FW}$)として示した。

4. 統計処理

統計処理にはエクセル統計 (BellCurve)を用い、実

験結果は平均値 \pm 標準偏差 (SD)で表した。一元配置分散分析の後、Tukey Kramerの多重比較検定により危険率5%以下を有意差ありと判定した ($p<0.05$)。

実験結果および考察

1. 品種および収穫時期によるパプリカのSOAC値の違い

品種および収穫時期の違いがパプリカの抗酸化能に与える影響を明らかにする為に、カロテノイド類の寄与が高い一重項酸素消去能を評価した (図1)。その結果、パプリカのSOAC値は、‘サッポロ’が 17.5 ± 2.2 から $26.9\pm 0.3\ \mu\text{mol } \alpha\text{-Toc/g FW}$ 、‘フェラーリ’は 15.8 ± 1.4 から $44.1\pm 4.6\ \mu\text{mol } \alpha\text{-Toc/g FW}$ 、‘ヘルシンキ’は 5.3 ± 1.8 から $14.5\pm 8.3\ \mu\text{mol } \alpha\text{-Toc/g FW}$ 、‘コレッティ’は 6.3 ± 1.7 から $9.6\pm 1.8\ \mu\text{mol } \alpha\text{-Toc/g FW}$ 、‘グローリー’は 15.4 ± 1.8 から $20.1\pm 3.1\ \mu\text{mol } \alpha\text{-Toc/g FW}$ の範囲であった。赤肉種である‘フェラーリ’は10月に収穫されたものが最もSOAC値が高く、9月に収穫されたものが最も低い値を示した。それ以外のパプリカの品種に関しては、収穫時期によるSOAC値の違いは認められなかった。

パプリカの一重項酸素消去能は、品種よりも果肉色の違いによる影響が大きく、赤、橙、そして黄色の順に抗酸化能が高い傾向にあった。Kimらの研究報告によれば、パプリカは同色果肉の品種間において、カロテノイド類の組成および総量に違いは見られないとされる⁷⁾。このことが、同色果肉の場合では品種間のSOAC値に違いが見られなかった理由と考えられる。また、カロテノイドの総量は橙肉種が最も高く、赤肉種と黄肉種は同じ程度であることが報告されている⁷⁾。本研究の結果において赤肉種の方が黄肉種に比べてSOAC値が高かったことから (図1)、カロテノイド類総量ではなく、組成の違いがSOAC値に影響していることが考えられた。Kimらの研究報告によれば、赤肉種にはcapsanthinおよびcapsorubinが特徴的に含まれており、黄肉種にはluteinが、橙肉種には β -caroteneが多く含まれていることが明らかにされている⁶⁾。さらに、橙肉種のカロテノイド類の組成に関して、zeaxanthinが総カロテノイド量の約7割を占めており、次にluteinが約2割程度であることも報告されている⁷⁾。向井らの研究報告によれば、カロテノイド類では、lycopene, astaxanthin, β -carotene, capsanthin, zeaxanthin, α -carotene, そしてluteinの順にSOAC値が高いことが示されている⁸⁾。また、SOAC法測定によって得られる

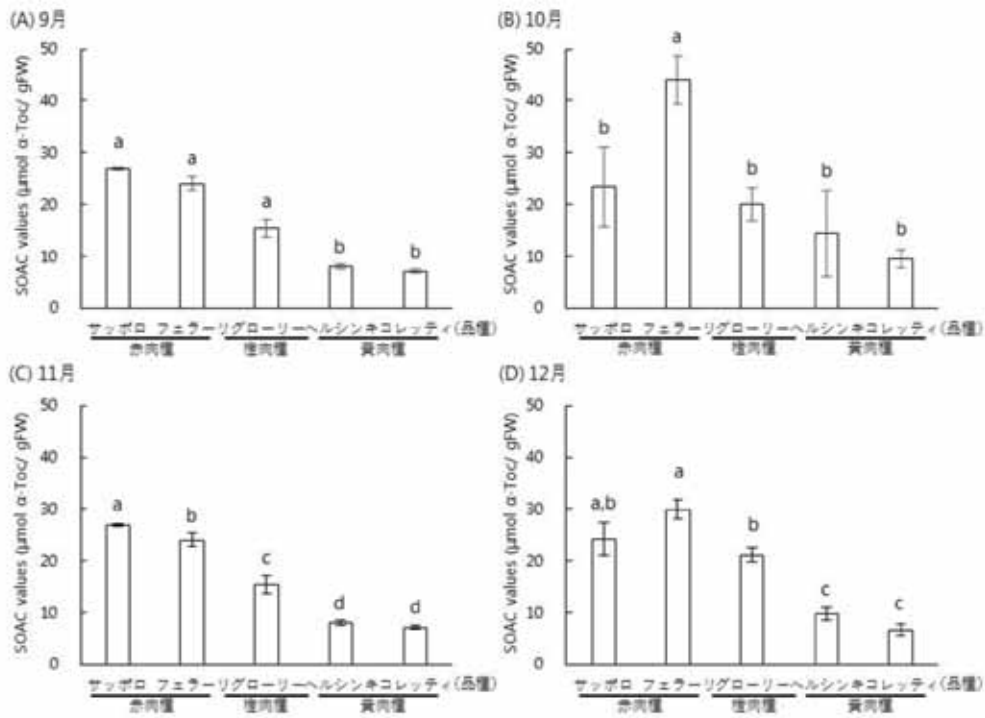


図1. 品種によるパプリカのSOAC値の違い

A: 9月; B: 10月; C: 11月; D: 12月に収穫されたパプリカ5品種の抗酸化能をSOAC法により評価した. 値は平均値±標準偏差で表した (n=3). 異符号間で有意差あり.

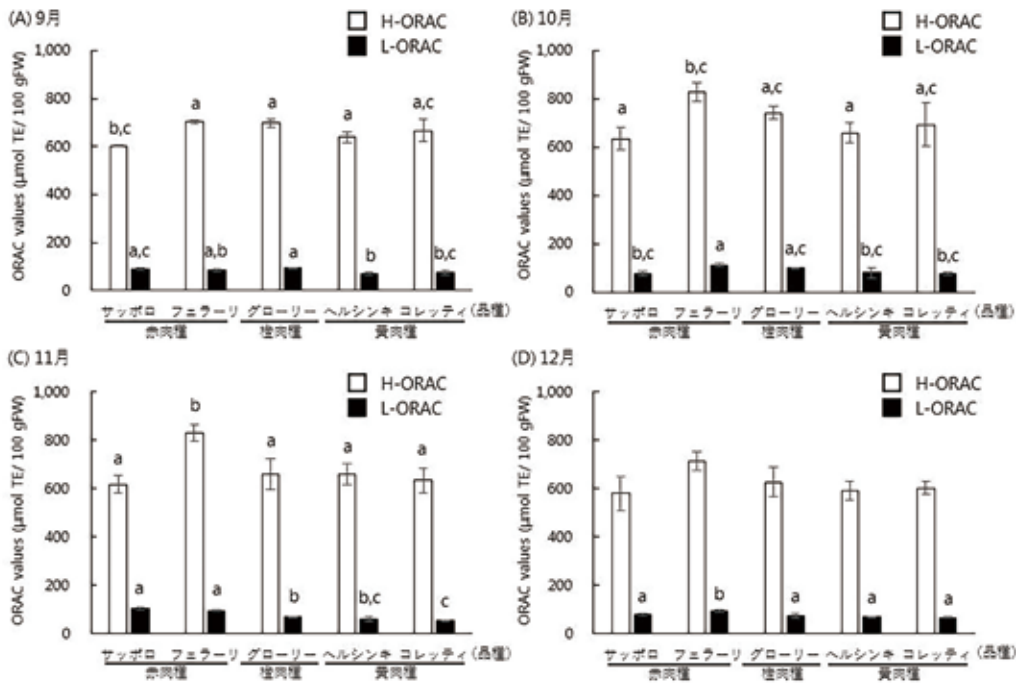


図2. 品種によるパプリカのORAC値の違い

A: 9月; B: 10月; C: 11月; D: 12月に収穫されたパプリカ5品種の抗酸化能をH-, またはL-ORAC法を用いて評価した. 値は平均値±標準偏差で表した (n=3). 異符号間で有意差あり.

野菜の実測値とその野菜に含まれているカロテノイド類のSOAC値から計算して得られる理論値の誤差が少ないことも報告されている⁹⁾。これらの報告から、カロテノイド総量は同程度でも、SOAC値の高いカロテノイド類を多く含む赤肉種の方が黄肉種よりSOAC値が高くなることが推察される。以上のことより、カロテノイド総量だけではなく、含まれているカロテノイド類の組成もパプリカの一重項酸素消去能に影響することが考えられる。

2. 品種および収穫時期によるパプリカのORAC値の違い

パプリカの抗酸化能はL-H-ORAC値とも品種による差異が認められたが、赤肉種の‘フェラーリ’は、H-ORACが703.3から832.8 $\mu\text{mol TE}/100\text{ gFW}$ 、L-ORACが87.3から113.7 $\mu\text{mol TE}/100\text{ gFW}$ という値を示し、いずれの収穫時期においても、同一収穫日の比較では他の品種よりも抗酸化能が高くなることが認められた。収穫時期による変動は、H-ORAC値よりもL-ORAC値の方がばらつきは大きいですが、その変動の幅も品種によって異なり、栽培時期による抗酸化能値の差が認められる品種（L-ORAC: ‘サッポロ’, ‘フェラーリ’, ‘グロリー’, ‘コレッティ’, H-ORAC: ‘フェラーリ’)と、あまり変化のない品種が存在した。

ORAC値については、ポリフェノール等の寄与が大きく、カロテノイド類の寄与がほとんどないため、SOAC値のように果肉色による特徴はあまり認められなかった。パプリカのORAC値にはluteolinの寄与が大きいという報告があることから¹⁰⁾、luteolin含有量の変動との関連、あるいは他の寄与成分の同定などについて、今後検討を進める。

要 約

酸化ストレスが様々な疾病に寄与していることが明らかにされており、食品由来の抗酸化物質の摂取が重要視されてきている。本研究では、ラジカル捕捉能を測定するORAC法および一重項酸素消去能を測定するSOAC法を用いて、品種および収穫時期によるパプリカの抗酸化能の変動に関して基礎的な知見を得ることを目的とした。その結果、品種および収穫時期はパプリカの抗酸化能に影響を及ぼすことが明らかとなった。

謝 辞

本研究は、復興庁・農林水産省の実証研究事業「被災地の復興のための先端技術展開事業」(農官2-02)によって得られた成果である。本研究において実験補助を行っていただいた十山善子氏、山本充子氏、および今野友美子氏にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kalyanaraman, B., Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.*, **8**, 244-257 (2013).
- 2) Watanabe, J., Oki, T., Takebayashi, J., Yamasaki, K., Takano-Ishikawa, Y., Hino, A., and Yasui, A., Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Anal. Sci.*, **28**, 159-165 (2012).
- 3) Watanabe, J., Oki, T., Takebayashi, J., Yada, H., Wakagi, M., Takano-Ishikawa, Y., and Yasui, A., Improvement and Interlaboratory Validation of the Lipophilic Oxygen Radical Absorbance Capacity: Determination of Antioxidant Capacities of Lipophilic Antioxidant Solutions and Food Extracts. *Anal. Sci.*, **32**, 171-175 (2016).
- 4) Ouchi, A., Aizawa, K., Iwasaki, Y., Inakuma, T., Terao, J., Nagaoka, S., and Mukai, K., Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoids and food extracts in solution. Development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. *J Agric Food Chem.* **58**, 9967-9978 (2010).
- 5) Takahashi, S., Iwasaki-Kino, Y., Aizawa, K., Terao, J., and Mukai, K., Development of Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method Using a Microplate Reader. *JAOAC Int.* **99**, 193-197 (2016).
- 6) Kim, J. S., Ahn, J., Lee, S. J., Moon, B., Ha, T. Y., and Kim, S., Phytochemicals and antioxidant activity of fruits and leaves of paprika (*Capsicum annum* L., var. Special) cultivated in Korea. *Journal of Food Science*, **76**, C193-C198 (2011).
- 7) Kim, J. S., An, C. G., Park, J. S., Lim, Y. P., Kim,

- S., Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food Chem.* **201**, 64-71 (2016).
- 8) Mukai, K., Ouchi, A., Takahashi, S., Aizawa, K., Inakuma, T., Terao, J., and Nagaoka, S., Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 3. Measurements of the SOAC values for phenolic antioxidants. *J Agric Food Chem.* **60**, 7905-7916 (2012).
- 9) Aizawa, K., Iwasaki, Y., Ouchi, A., Inakuma, T., Nagaoka, S., Terao, J., and Mukai, K., Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 2. Measurements of the SOAC values for carotenoids and food extracts. *J Agric Food Chem.* **59**, 3717-3729 (2011).
- 10) 庄子真樹, 抗酸化性評価ORACを用いたパプリカの機能成分の検証, 東北農業研究, 62, 219-220 (2009)