

リーフレタスの DPPH ラジカル消去成分

澤井祐典[§]・沖 智之・西場洋一・奥野成倫・須田郁夫¹⁾・大和陽一²⁾

(2013年8月9日 受理)

要 旨

澤井祐典・沖 智之・西場洋一・奥野成倫・須田郁夫・大和陽一 (2014) リーフレタスの DPPH ラジカル消去成分。九州沖縄農研報告 61:23-34.

緑色系と赤色系のリーフレタスについて、ポリフェノール含量、DPPH ラジカル消去活性を測定した。緑色系よりも赤色系のリーフレタスの方が総ポリフェノール含量、DPPH ラジカル消去活性ともに高かった。HPLC による分析結果は、緑色系のリーフレタスに含まれる主要なポリフェノールはチコリ酸であり、赤色系のリーフレタスに含まれる主要なポリフェノールはチコリ酸、クロロゲン酸とケルセチン-3-マロニルグルコシドであることを示した。さらにチコリ酸、クロロゲン酸と、ケルセチン-3-マロニルグルコシドのモデル化合物であるルチン(ケルセチン-3-ルチノシド)の標品のポリフェノール含量(Gallic acid eq.)と DPPH ラジカル消去活性(Trolox eq.)を求め、リーフレタスにおける各成分の寄与度を考察した。その結果として、DPPH ラジカル消去活性に寄与する主要なポリフェノールは、緑色系ではチコリ酸、赤色系ではチコリ酸、ケルセチン-3-マロニルグルコシド、クロロゲン酸の3成分であることを明らかにした。

キーワード：植物工場、リーフレタス、ポリフェノール、チコリ酸、クロロゲン酸、ケルセチン-3-マロニルグルコシド、抗酸化活性。

I. 緒 言

世界的な食料不足や、頻発する自然災害による不安定な食料供給問題から、近年注目を集めているのが、天候に左右されずに屋内で野菜などを栽培できる植物工場である。屋内で人工光を用いて栽培する植物工場は、弱い光でも育つキク科のレタス (*Lactuca sativa* L.) などの葉物野菜が主な栽培対象となっている。

レタスは水分が多いことが知られていたため、これまでレタスに含まれる栄養成分に関する研究はほとんど行われてこなかったのが現状である。しかし、人工光型植物工場を用いて栄養成分・機能性成分含量も保証されたレタスを安定供給できるようになれば、植物工場産レタスの需要の増加が見込まれるようになると思われる。

レタスには結球レタス (var. *capitata*) やリーフレタス (var. *crispa*) など様々な種類が存在し、このうち

現在多くの植物工場で栽培されているのはリーフレタスである。さらにリーフレタスには緑色系(グリーンリーフレタス)のほかに、サニーレタスのように葉の赤い赤色系(レッドリーフレタス)も存在する^{1,2,3,4,5,6,7)}。

そこで本研究では、リーフレタスの緑色系と赤色系について、総ポリフェノール含量と抗酸化活性の測定を行い、それらを比較し、抗酸化活性に対するポリフェノール成分の寄与度を推定する新しい知見が得られたので報告する。

本研究の一部は、農林水産省「植物工場普及・拡大総合対策事業(1)モデルハウス型植物工場実証・展示・研修事業」により整備された独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構植物工場九州実証拠点の施設において行われた。株式会社福岡園芸をはじめ完全人工光型植物工場「レタスの高付加価値生産」コンソーシアムに参加し、研究に協力くださった方々に感謝します。

II. 材料および方法

1. 供試材料

供試したリーフレタスの種子は株式会社福岡園芸をはじめコンソーシアムからの提供を受け、農研機構植物工場九州実証拠点（福岡県久留米市）において、屋内で光合成光量子束密度（PPFD） $183 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の人工光（Hf 蛍光灯）を用いて日長 16/8 時間（明/暗期）、気温 $24/18^\circ\text{C}$ （明/暗期）、相対湿度 70%、 CO_2 濃度 1,000 ppm となるよう制御し、17日間の育苗の後、同様の条件で PPFD $187 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ において

20日間かけて循環式湛液型水耕栽培を行った。培養液として、育苗中は大塚 A 処方 1/2 単位を、定植後は大塚 A 処方 2/3 単位に大塚ハウス 5 号を加えたものを用いた。

緑色系のリーフレタスとしては福岡園芸の 6 系統（001, 002, 003, G05, G25, G63）とフリルアイス（雪印種苗）、ノーチップ（横浜植木）を用いた。赤色系のリーフレタスとしては福岡園芸の 3 系統（R40, R52, R68）を用いた（写真 1）。それらの各々は、3 株ずつを供試材料とし、凍結乾燥させた後、以下に示す分析を行い、測定値の平均で結果を示した。

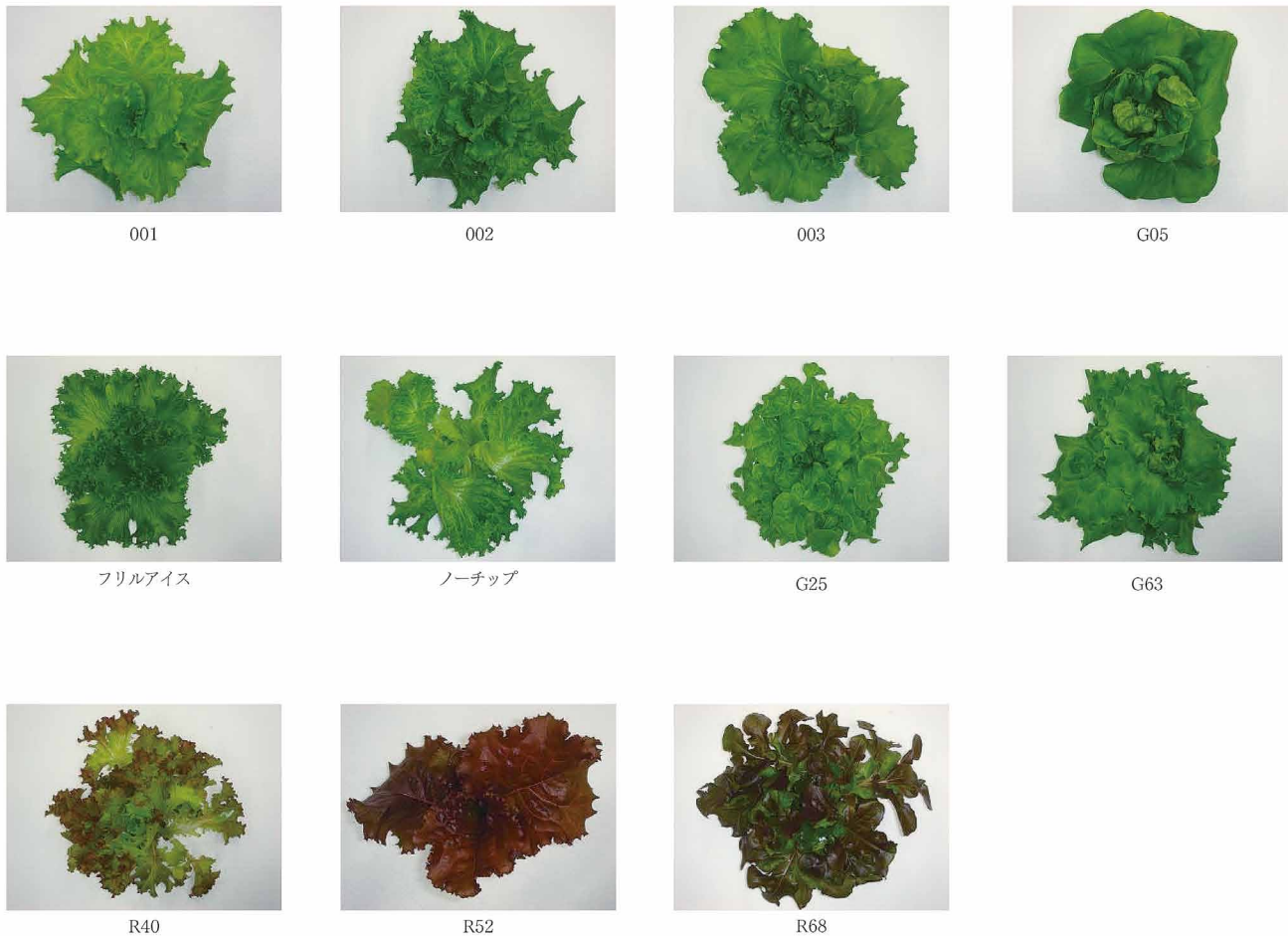


写真 1 供試リーフレタス

2. 供試材料の凍結乾燥

供試材料は芯を除いた葉身を液体窒素を用いて凍結し、 -10°C で凍結乾燥を行った。凍結乾燥は乾燥重量が一定になるまで続けた。乾燥前と乾燥後の重量差により水分含量を求めた。

3. 総ポリフェノール含量の測定

フォリン-チオカルト法^{8,9)}により、レタス凍結乾燥品に含まれる総ポリフェノールの含量測定を行った。

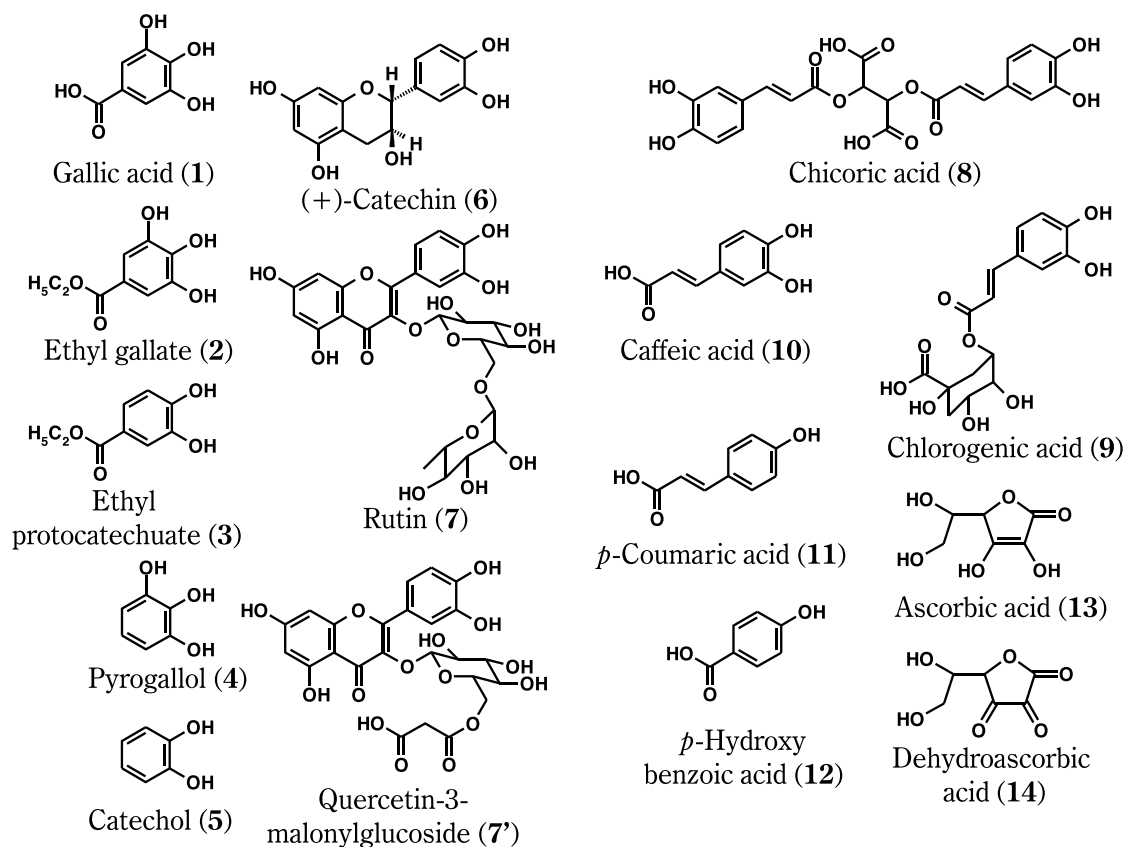
新鮮物重量で1 g相当量の凍結乾燥粉末各々に80%エタノール2.5 mLを加え10秒間攪拌し、さらに80%エタノール2.5 mLを加え10秒間攪拌後、室温・暗所下で16時間放置した。遠心分離(日立 himac CF7D2, 3,000 rpm, 20分)で上清を回収後、残渣に同様に80%エタノール2.5 mLを2回にわたって加え、再度遠心分離により上清を回収して、併せて10 mLに定容し、ポリフェノール抽出液とした。

上記の抽出液はISO14502-1⁸⁾に基づき、エタノー

ル濃度が20%を超えない範囲で適宜超純水により希釈し、その1 mLに対しフェノール試薬(Wako製市販品の10倍希釈液を用いる)5 mLを加えた後、8分以内に7.5% (W/V)炭酸ナトリウム水溶液4 mLを加え、1時間室温放置後、分光光度計(日本分光, V-500シリーズ)を用いて765 nmにおける吸光度を測定した⁹⁾。

検量線は10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に溶解した没食子酸を用いて作成し、試料中の総ポリフェノール含量を没食子酸相当量として求めた。

また、各種水溶性抗酸化性物質の総ポリフェノール測定法における測定値(没食子酸相当量)を調べるために、市販の水溶性抗酸化物質(第1図, 第1表)を購入し、0.2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 溶液を調製し、同様に総ポリフェノール含量として測定を行い、測定値($\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-標品}$)を求めた。なお測定に用いた標品の製造元と純度を第1表に示す。



第1図 供試標品の構造式

第1表 各種水溶性抗酸化物質の総ポリフェノール測定法およびDPPHラジカル消去活性測定法における測定値の比較

標品	分子量	製造元	純度 (%)	ポリフェノール測定法 (a) ($\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-標品}$)	DPPHラジカル消去活性測定法 (b) ($\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol-標品}$)
Gallic acid (1)	170	Wako	98-103	1.00	3.24
Ethyl gallate (2)	198	関東化学	98.0	1.05	2.44
Ethyl protocatechuate (3)	182	SIGMA	97	1.28	2.05
Pyrogallol (4)	126	Wako	99.0	1.00	2.10
Catechol (5)	110	Wako	99.0	1.10	1.13
(+)-Catechin (6)	290	SIGMA	98	2.44	1.57
Rutin (7)	610	Wako	90.0	2.32	1.37
Quercetin-3-malonylglucoside (7')	550	-	-	-	-
Chicoric acid (8)	474	SIGMA	95	2.43	2.28
Chlorogenic acid (9)	354	Wako	95.0	1.42	1.08
Caffeic acid (10)	180	SIGMA	98.0	1.28	1.77
<i>p</i> -Coumaric acid (11)	164	SIGMA	98.0	1.06	0.19
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (12)	138	Wako	95	0.70	0.07
Ascorbic acid (13)	176	Wako	99.5	0.64	0.96
Dehydroascorbic acid (14)	174	Wako	-	0.36	0.02

標品に添付した数字は第1図に示した構造式の数字と一致する。
ケルセチン-3-マロニルグルコシド (7') の代替品としてルチン (7) を供試した。

4. DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性の測定に用いた抽出液は、ポリフェノール含量の測定に用いた抽出液と同じものを用いた。抽出液は終濃度 50% エタノールになるように適宜希釈し、既報に準じて 96 穴マイクロプレート法で測定し、その活性をトロロックス相当量として算出した^{10, 11)}。

また、各種水溶性抗酸化物質の DPPH ラジカル消去活性測定法における測定値 (Trolox 相当量) を調べるために、前述のように市販の水溶性抗酸化物質 (第1図, 第1表) の $0.2\mu\text{mol/mL}$ 溶液を調製し、同様に DPPH ラジカル消去活性を測定し、測定値 ($\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol-標品}$) を求めた。

5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

ポリフェノールの分析は寺原ら¹²⁾の方法に準じて、HPLC (日本分光, LC-2000 シリーズ) を用いて行った¹³⁾。

市販の標品を用いてクロロゲン酸 (9)、チコリ酸 (8) の定量を行った。また、ケルセチン-3-マロニルグルコシド (7') は市販のルチン (7) を標品に用いて定量し、ルチン相当量で表した。分析システムおよび分析条件は以下のとおりである。

オートサンプラー: AS-2057 Plus

デガッサー: DG-2080-53

ポンプ: PU-2080 i Plus (1台)

低圧グラジエントユニット: LG-2080-02

カラムオーブン: CO-2060 Plus

検出器: UV-2070 Plus

カラム: Cadenza CD-C18 (ϕ 4.6 mm \times 250 mm, 3 μm , Imtakt)

移動相: A 溶媒; 0.6% (v/v) ギ酸

B 溶媒; アセトニトリル

溶離条件: B12.5% \rightarrow 22.5% (40 分間, 0.6%/分), 直線グラジエント

流速: 0.6 mL/分

検出波長: 325 nm

カラム温度: 30°C

試料注入量: 5 μL

各ポリフェノールについて、上記と同様の HPLC 分析条件を用い、HPLC (Agilent, 1100 シリーズ) およびイオントラップ型質量分析計 (Bruker Daltonics, esquire 3000 plus) を用いた高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) でエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (ネガティブイオンモード) により分子量を確認した。

III. 結果および考察

1. リーフレタスの総ポリフェノール含量と DPPH ラジカル消去活性

これまで、日本国内において生産されたレタス類を用いて DPPH ラジカル消去活性を測定した報告としては、サニーレタスが結球レタスよりも活性が高いという報告があるのみで、リーフレタスについて調査した報告は少ない^{1, 14, 15)}。

そこで、農業・食品産業技術総合研究機構植物工場九州実証拠点 (福岡県久留米市) において人工光を

第2表 リーフレタス(緑色系, 赤色系)の総ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去活性

	可食部新鮮物重量 (g/株) 平均 ± SD	総ポリフェノール (mg-Gallic acid eq./g-FW) 平均 ± SD	DPPH ラジカル消去活性 ($\mu\text{mol-Trolox eq./g-FW}$) 平均 ± SD	各ポリフェノールの含量 (A)		
				Chlorogenic acid 含量 ($\mu\text{mol/g-FW}$) 平均 ± SD	Chicoric acid 含量 ($\mu\text{mol/g-FW}$) 平均 ± SD	Quercetin-3-malonylglucoside 含量 (Rutin eq.) ($\mu\text{mol/g-FW}$) 平均 ± SD
緑色系						
001	37.7 ± 5.5 ^b	0.60 ± 0.04 ^e	3.23 ± 0.08 ^{de}	0.07 ± 0.01 ^{cd}	0.72 ± 0.02 ^d	0.30 ± 0.04 ^c
002	70.0 ± 6.4 ^a	0.73 ± 0.03 ^e	3.87 ± 0.56 ^d	0.29 ± 0.04 ^{cd}	0.65 ± 0.04 ^d	0.25 ± 0.02 ^c
003	82.3 ± 8.6 ^a	0.35 ± 0.06 ^e	1.43 ± 0.37 ^e	0.05 ± 0.02 ^d	0.22 ± 0.10 ^f	0.09 ± 0.02 ^c
G05	71.7 ± 2.8 ^a	0.59 ± 0.04 ^e	2.97 ± 0.34 ^{de}	0.22 ± 0.02 ^{cd}	0.47 ± 0.04 ^{def}	0.17 ± 0.03 ^c
G25	43.8 ± 9.1 ^b	1.02 ± 0.04 ^d	5.35 ± 0.23 ^d	0.60 ± 0.06 ^{bc}	1.08 ± 0.11 ^c	0.49 ± 0.12 ^c
G63	62.6 ± 5.7 ^a	0.56 ± 0.06 ^e	2.75 ± 0.48 ^{de}	0.14 ± 0.03 ^{cd}	0.51 ± 0.04 ^{def}	0.19 ± 0.03 ^c
フリルアイス	69.8 ± 3.7 ^a	0.43 ± 0.02 ^e	1.84 ± 0.30 ^{de}	0.11 ± 0.02 ^{cd}	0.30 ± 0.01 ^{ef}	0.12 ± 0.02 ^c
ノーチップ	68.2 ± 9.0 ^a	0.63 ± 0.05 ^e	2.96 ± 0.58 ^{de}	0.23 ± 0.04 ^{cd}	0.53 ± 0.09 ^{def}	0.19 ± 0.02 ^c
8種全体	63.3 ± 6.3	0.61 ± 0.20	3.05 ± 1.21	0.21 ± 0.18	0.56 ± 0.27	0.23 ± 0.13
赤色系						
R40	42.7 ± 5.4 ^b	1.93 ± 0.15 ^c	11.70 ± 0.73 ^c	0.81 ± 0.05 ^b	1.79 ± 0.11 ^b	1.49 ± 0.32 ^b
R52	20.8 ± 2.3 ^b	3.21 ± 0.14 ^a	20.74 ± 0.54 ^a	1.58 ± 0.19 ^a	2.70 ± 0.09 ^a	2.54 ± 0.37 ^a
R68	41.4 ± 11.7 ^b	2.47 ± 0.17 ^b	15.21 ± 1.40 ^b	1.61 ± 0.46 ^a	1.96 ± 0.20 ^b	1.55 ± 0.24 ^b
3種全体	35.0 ± 6.5	2.54 ± 0.64	15.88 ± 4.56	1.33 ± 0.45	2.15 ± 0.48	1.86 ± 0.59

総ポリフェノール含量はフリン-チオカルフ法で、DPPHラジカル消去活性はマイクロプレート法を用いて測定した。クロロゲン酸、チコリ酸、ケルセチン-3-マロニルグルコシドはHPLCを用いて定量した (n=3)。異なるアルファベット間で有意差あり ($p < 0.01$)。

用いて栽培されたリーフレタスについて、総ポリフェノール含量と DPPH ラジカル消去活性を測定し、その結果を第2表に示した。

総ポリフェノール含量と DPPH ラジカル消去活性はいずれも緑色系よりも赤色系のリーフレタスの方が高かった。新鮮物重量あたりでは、総ポリフェノール含量の平均値は緑色系よりも赤色系のリーフレタスの方が4.2倍高かった。DPPH ラジカル消去活性においては緑色系よりも赤色系のリーフレタスの方が5.2倍高かった。緑色系の品種間、赤色系の品種間ではそれらの含量および活性に大きな変動はなかった。

なお、供試したリーフレタスの水分含量は95～96%であった。1株あたりの可食部の新鮮物重量は緑色系の方が赤色系よりも平均して2倍近く多かった(第

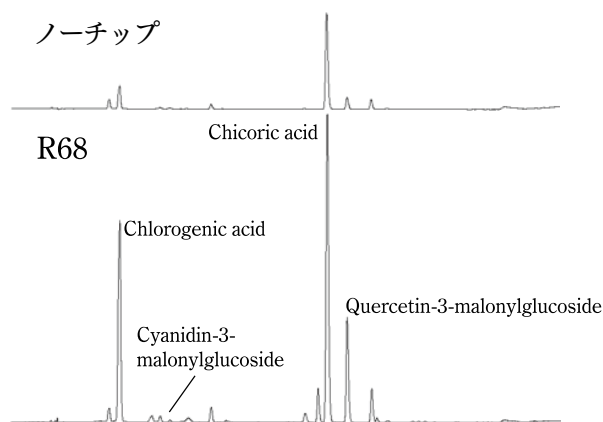
2表)。

2. リーフレタスに含まれるポリフェノール成分

一般的にレタスなどキク科の野菜はアスコルビン酸含量が低い^{16, 17)}ため、DPPH ラジカル消去活性に関与する成分の大半はポリフェノール類と考えられる。また、レタスに含まれるポリフェノールはカフェ酸誘導体のチコリ酸(ジカフェオイル酒石酸)(8)が特徴的な成分として知られている^{18, 19, 20)}。

そこで、HPLC および LC-MS を用いてリーフレタスのポリフェノール組成を調べ、DPPH ラジカル消去活性に関与する成分の推定を行った。

緑色系と赤色系のリーフレタスの80%エタノール抽出液の典型的なHPLCクロマトグラムを第2図に示



第2図 リーフレタス 80% エタノール抽出液の HPLC クロマトグラム

ノーチップ: 緑色系リーフレタス

R68: 赤色系リーフレタス

す。緑色系のリーフレタスには、これまでの報告と同じくチコリ酸 (8) が含まれていた。赤色系には、緑色系よりもさらに多くのチコリ酸が含まれていた。加えて赤色系のリーフレタスにはクロロゲン酸 (9) とケルセチン-3-マロニルグルコシド (7') が主要なポリフェノール成分として含まれていた¹⁸⁾。

それらの含量を標品を用いて定量し、結果を第2表に示した。リーフレタスのチコリ酸含量の平均値は、緑色系よりも赤色系の方が3.8倍多かった。それらのチコリ酸含量に対し、リーフレタスに含まれるクロロゲン酸、ケルセチン-3-マロニルグルコシドの割合は、緑色系の場合では各々0.375, 0.411であったのに対し、赤色系の場合には各々0.619, 0.865と緑色系よりも比率を高めた。したがって、赤色系のリーフレタスの特徴はチコリ酸も含めたこれら3種類のポリフェノール含量の多さであった。

なお、複数波長を用いて検討を行った結果、赤色系のリーフレタスの赤色素成分であるアントシアニン(シアニジン-3-マロニルグルコシド)²⁰⁾ は上記3種のポリフェノールに比べるとその含量は低いことが確認されている。

3. ポリフェノール測定法と DPPH ラジカル消去活性測定法における水溶性抗酸化物質の測定値の比較

リーフレタスに含まれる主要なポリフェノール3成分の総ポリフェノール測定法(フォリン-チオカルト法)とDPPHラジカル消去活性測定法における寄与度を調べるため、代表的な水溶性抗酸化性物質の標品(第1図, 第1表)の一定濃度の溶液を用いてポリフェノール測定法およびDPPHラジカル消去活性測定法に供試し、その測定値をモル単位で求めた(第1表)。

フォリン-チオカルト法はポリフェノールの還元性を利用して、リンタングステン酸およびモリブデン酸錯体の還元による着色を比色定量する方法であり^{21, 22, 23)}、化合物分子中に二重結合が交互に連なった共役二重結合が多いほど着色しやすいと考えられている²⁴⁾。

フォリン-チオカルト法における検量線にはフェノール性水酸基が3個ある没食子酸(1)が用いられるが、没食子酸の測定値を1と表したとき、化学構造の似ている没食子酸エチル(2)の測定値は1.05 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、ピロガロール(1,2,3-トリヒドロキシベンゼン)(4)の測定値は1.00 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、大きな違いはなかつ

た。フェノール性水酸基が2個あるカテコール(1,2-ジヒドロキシベンゼン)(5)でもその測定値は1.10 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であったため、フェノール性水酸基の数が2個か3個かはポリフェノール測定系の反応に大きな影響を及ぼさないと推測された。しかし、フェノール性水酸基が1個の

-ヒドロキシ安息香酸(モノヒドロキシ安息香酸)(12)の測定値は0.70 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、フェノール性水酸基が2個以上ある化合物と比較して発色が弱かった。

カフェ酸(10)の測定値は1.28 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、クロロゲン酸(モノカフェオイルキナ酸)(9)の測定値は1.42 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であった。カフェ酸やクロロゲン酸は没食子酸よりも分子中の共役二重結合の数が多いため、よりフェノール試薬を発色させやすいと考えられた。一方、カフェ酸とエステル結合したキナ酸は、発色にはほとんど影響を与えないようであった。フェノール性水酸基が1個の

-クマル酸(モノヒドロキシケイ皮酸)(11)の測定値は1.06 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、フェノール性水酸基が2個のカフェ酸(ジヒドロキシケイ皮酸)と比較して発色が弱かった。

さらにルチン(7)の測定値は2.32 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、(+)-カテキン(6)の測定値は2.44 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であったため、三環構造のフラボノイドなど、1分子中の共役二重結合の数が多いポリフェノールはよりポリフェノール測定系で発色しやすい構造といえた。配糖体であるルチンと遊離の(+)-カテキンの没食子酸相当量がほぼ同じであることから、フラボノイドに結合する糖はクロロゲン酸のキナ酸と同様にポリフェノール測定系での反応にほとんど影響を与えていないことが示された。

還元型のアスכולビン酸(13)の測定値は0.64 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、ポリフェノール測定系でわずかながら発色されることが確認された。しかしながら酸化型のデヒドロアスכולビン酸(14)の測定値は0.36 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、還元型のアスכולビン酸と比較するとポリフェノール測定系での発色が弱かった。

リーフレタスに含まれるチコリ酸(ジカフェオイル酒石酸)(8)の測定値は2.43 $\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol-}$ 標品であり、モノカフェオイルキナ酸であるクロロゲン

酸と比較すると1分子あたりではポリフェノール測定系でより強く発色されることが確認された。

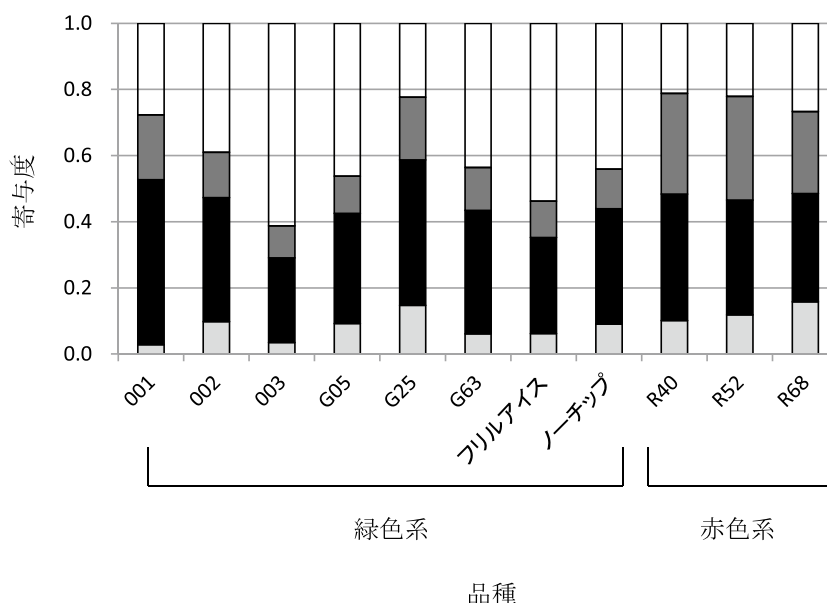
一方, DPPH ラジカル消去活性の測定法も, 抗酸化物質の還元性を利用した方法であるが, これは隣り合ったフェノール性水酸基の数が関係していると考えられている^{25, 26, 27, 28, 29}。そこで, 第1図の標品のDPPH ラジカル消去活性の測定値(第1表)を, 隣り合ったフェノール性水酸基の数にしたがって整理すると以下ようになる。

フェノール性水酸基が1個の *p*-ヒドロキシ安息香酸(モノヒドロキシ安息香酸)(12)の測定値は0.07 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$, *p*-クマル酸(モノヒドロキシケイ皮酸)(11)の測定値は0.19 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$ であるのに対し, フェノール性水酸基が2個隣り合ったカテコール(1,2-ジヒドロキシベンゼン)(5)の測定値は1.13 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$, カフェ酸(ジヒドロキシケイ皮酸)(10)の測定値は1.77 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$, クロロゲン酸(モノカフェオイルキナ酸)(9)の測定値は1.08 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$, (+)-カテキン(6)の測定値は1.57

$\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$, ルチン(ケルセチン-3-ルチノシド)(7)の測定値は1.37 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$ であった。水酸基が1個あるポリフェノールより水酸基が2個隣り合ったポリフェノールの方が活性が高いことが確認された。さらに, フェノール性水酸基が3個隣り合ったピロガロール(1,2,3-トリヒドロキシベンゼン)(4)の測定値は2.10 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$, 没食子酸(1,2,3-トリヒドロキシ安息香酸)(1)の測定値は3.24 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$, 没食子酸エチル(2)の測定値は2.44 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$ であり, 隣り合った水酸基が増えるにしたがって活性が高まることが確認できた。

還元型のアスコルビン酸の測定値は0.96 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$ であるのに対し, 酸化型のアスコルビン酸の測定値は0.02 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$ であり, ほとんど活性がなかった。

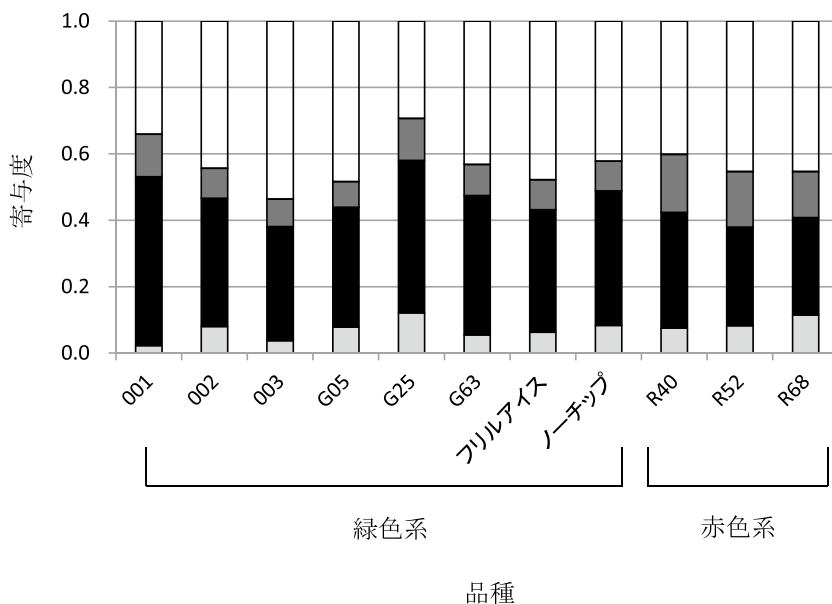
リーフレタスに含まれるチコリ酸(ジカフェオイル酒石酸)の測定値は2.28 $\mu\text{mol-Trolox eq.}/\mu\text{mol- 標品}$ であり, モノカフェオイルキナ酸であるクロロゲン酸と比較して2倍程度活性が高いことが確認された。



第3図 リーフレタスの総ポリフェノール含量に占める各ポリフェノールの寄与度

総ポリフェノール測定法における関与成分候補の寄与推定値は, 標品のフォリン-チオカルト法における測定値 a (第1表) とリーフレタス抽出液のHPLCによる測定値 A (第2表) をもとにして■: Chlorogenic acid, ■: Chicoric acid, ■: Quercetin-3-malonylglucoside の各々について次式により計算し, 3成分の合計値とリーフレタスの総ポリフェノール含量の実測値との差を□: Others とし, 実測値との比率で表した。

$$\text{寄与度 (mg-Gallic acid eq./g-FW)} = a (\mu\text{mol-Gallic acid eq.}/\mu\text{mol- 標品}) \times A (\mu\text{mol/g-FW}) \times \text{没食子酸の分子量} / 1000$$



第4図 リーフレタスのDPPHラジカル消去活性に占める各ポリフェノールの寄与度
DPPHラジカル消去活性における関与成分候補の寄与推定値は標品の活性b(第1表)とリーフレタス抽出液のHPLCによる測定値A(第2表)をもとにして■: Chlorogenic acid, ■: Chicoric acid, ■: Quercetin-3-malonylglucosideの各々について次式により計算し, 3成分の合計値とリーフレタスのDPPHラジカル消去活性の実測値との差を□: Othersとし, 実測値との比率で表した。
寄与度 ($\mu\text{mol-Trolox eq./g-FW}$) = b ($\mu\text{mol-Trolox eq./}\mu\text{mol- 標品}$) \times A ($\mu\text{mol/g-FW}$)

4. ポリフェノール測定法とDPPHラジカル消去活性測定法におけるリーフレタス含有ポリフェノール類の寄与度の推定

以上のことから, 赤色系のリーフレタスの主要ポリフェノールであるクロロゲン酸(9), チコリ酸(8), ケルセチン-3-マロニルグルコシド(7')について, 緑色系と赤色系のリーフレタスの総ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去活性における各成分の寄与度を第1表と第2表の測定値をもとに第3図, 第4図の計算式にしたがい算出した。

なお, 前述したように, ケルセチン-3-マロニルグルコシド(7')については, ポリフェノール測定法およびDPPHラジカル消去活性測定法での反応性はほぼアグリコン部位に由来すると考えられることから, 同じケルセチンの配糖体であるルチン(7)をモデル化合物としてルチン相当量で寄与率の算出を行った。

第3図から, 総ポリフェノール含量に対しては, 上記のポリフェノール主要3成分の関与推定合計値は,

緑色系のリーフレタスの場合では全体の38.8~77.7%(平均60.9%)を占めており, 赤色系のリーフレタスの場合では73.3~78.8%(平均76.6%)を占めていた。一方, 第4図より, DPPHラジカル消去活性に対しては, ポリフェノール主要3成分の関与推定合計値は, 緑色系のリーフレタスの場合では全体の46.4~70.7%(平均59.4%)を占めており, 赤色系のリーフレタスの場合では54.7~59.8%(平均56.0%)を占めていた。赤色系のリーフレタスの総ポリフェノール含量に対するポリフェノール主要3成分の関与推定合計値が, DPPHラジカル消去活性に対する関与推定合計値よりも高いのが特徴的であるが, これは主としてケルセチン-3-マロニルグルコシド(7')が, 総ポリフェノール測定法において, フェノール試薬に対してチコリ酸(8)と同程度に着色しやすいのに対し, DPPHラジカル消去活性はチコリ酸(8)よりも劣ることに由来する。

ポリフェノール主要3成分の中で, DPPHラジカル消去活性に対して最も寄与度の高かった成分は, 緑色

系ではチコリ酸 (8) (寄与度 41.8%) であった。これは緑色系には DPPH ラジカル消去活性測定法において測定値 $2.28 \mu\text{mol-Trolox eq.} / \mu\text{mol- 標品}$ を持つチコリ酸 (8) が、クロロゲン酸 (9) ($1.08 \mu\text{mol-Trolox eq.} / \mu\text{mol- 標品}$)、ケルセチン-3-マロニルグルコシド (7') (ルチンの測定値 $1.37 \mu\text{mol-Trolox eq.} / \mu\text{mol- 標品}$) よりも多く含まれていた (第2表) ことに起因すると考えられる。一方、赤色系でも DPPH ラジカル消去活性に対して寄与度の高かった成分はチコリ酸 (8) (寄与度 30.9%) であったが、クロロゲン酸 (9) (寄与度: 緑色系 7.5% → 赤色系 9.1%) およびケルセチン-3-マロニルグルコシド (7') (寄与度: 緑色系 10.1% → 赤色系 16.0%) も重要な関与成分であった。これはこの両成分は DPPH ラジカル消去活性はチコリ酸 (8) の約 1/2 と低いにもかかわらず、含量的には緑色系ではチコリ酸の含量の 4 割程度だったものが、赤色系では 6 ~ 9 割に相当する程度まで高まっていたことに起因する (第2表)。

以上述べてきたように、我々はリーフレタスの総ポリフェノール含量、DPPH ラジカル消去活性、HPLC によるポリフェノール個々の成分含量、およびポリフェノール測定法と DPPH ラジカル消去活性測定法におけるポリフェノール標品の測定値から、緑色系のリーフレタスの主要抗酸化成分はチコリ酸であり、赤色系のリーフレタスの主要抗酸化成分は、チコリ酸に加えてケルセチン-3-マロニルグルコシド、クロロゲン酸の 3 種であることを明らかにすることができた。DPPH ラジカル消去活性においては、上記 3 種では説明できない活性がまだ 40% 以上残されているため、今後は、今回検討できなかったアントシアニンなどの上記 3 種以外の微量ポリフェノールや、トコフェロールなどの脂溶性成分に関する解明も必要と考えられる。さらに、緑色系、赤色系それぞれの中での品種間差についてもさらに検討し、収穫量が多くかつ機能性の高い品種についても明らかにしていく必要がある。

これまで須田ら²⁷⁾ が黒大豆を用いて行ったように、農作物に含まれる抗酸化物質の標品の DPPH ラジカル消去活性を求めた報告はあるが、DPPH ラジカル消去活性測定系における各種標品の測定値とフォリン-チオカルト法を用いたポリフェノール測定系における標品の測定値を同時に求めて農作物に含まれる活性成分の寄与度を表した報告は初めてであるため、こうした試みは今後の研究に大いに役立つといえる。なぜ

なら本研究で示したように、HPLC により各種農作物に含まれる個々の成分の含量が測定できれば、その総ポリフェノール含量や DPPH ラジカル消去活性全体における個々の成分の寄与度を標品の測定値から推定することが可能となるからである。

クロロゲン酸 (9) は野菜、果実、イモ類など多くの農作物に含まれており^{30, 31)}、その DPPH ラジカル消去活性は $1.08 \mu\text{mol-Trolox eq.} / \mu\text{mol- 標品}$ であった。そのためこの値よりも高い活性を有する成分を高含量含む植物は、今後高い抗酸化活性を持つ素材として注目される。例えば、フェノール性水酸基が 3 個隣り合った没食子酸 (1) (測定値 $3.24 \mu\text{mol-Trolox eq.} / \mu\text{mol- 標品}$) およびその類似体を高含量含む茶葉は高い抗酸化活性を示し²⁸⁾、(+)-カテキン (6) (測定値 $1.57 \mu\text{mol-Trolox eq.} / \mu\text{mol- 標品}$) の縮合体であるプロアントシアニンを高含量含む黒大豆は、含まれていない黄大豆よりも高い抗酸化活性を示すことが明らかになっている³⁰⁾。さらに、リーフレタスと同じキク科植物である沖縄特産野菜のニガナもチコリ酸 (測定値 $2.28 \mu\text{mol-Trolox eq.} / \mu\text{mol- 標品}$) を多く含み、高い抗酸化活性を示す^{32, 33, 34)}。したがって、DPPH ラジカル消去活性 $2 \mu\text{mol-Trolox eq.} / \mu\text{mol- 標品}$ 以上を有する成分を高含量含む素材の発見は、今後高い抗酸化性素材の開発につながると考えられる。加えてこの後、作目別、品種別、栽培条件別などの差異による抗酸化性成分の変動に関するさらなる研究が必要である。

引用文献

- 1) 網本邦広・工藤りか・京正晴・福井宏至 (1997) 化学育種を目的とする野菜の成分分析 (第 3 報) -水耕レタス類の抗酸化活性の品種間比較-。植物工場学会誌 **9** (2) : 93 - 102.
- 2) Křitkova, E., Doležalova, I., Lebeda, A., Vinter, V., Novotna, A. (2008) Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Hort. Sci. (Prague)*. **35** (3) : 113 - 129.
- 3) Goubara, M., Takasaki, T. (2003) Flower visitors of lettuce under field and enclosure conditions. *Appl. Entomol. Zool.* **38** (4) : 571 - 581.
- 4) Fujii, H., Sasaya, T., Takezaki, A., Ishikawa, K.,

- Fujino, M. (2003) Resistance to lettuce big-vein disease in lettuce cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **72** (4) : 315 - 317.
- 5) 伊藤純雄・菊地直・加藤直人 (2013) ニンジンおよびレタス類の品種別カドミウム濃度の相対的序列推定. 中央農研研究報告 **18** : 15 - 35.
- 6) 藤田智 (2009) プランター菜園基本のキホン! その19 リーフレタス—華やかな葉物野菜—. はなとやさい **64** (7) : 37 - 39.
- 7) 板木利隆 (2010) 園芸作業 12 カ月, 家庭菜園編, 身近で育てて重宝するリーフレタス. はなとやさい **65** (3) : 53 - 54.
- 8) ISO 14502-1 (2005) Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.
- 9) 沖智之 (2009) 総ポリフェノールの定量法. 「食品機能性評価マニュアル集第 III 集」(食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編) p. 1-7. 食品科学工学会, つくば.
- 10) 沖智之 (2008) DPPH ラジカル消去活性評価法. 「食品機能性評価マニュアル集第 II 集」(食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編) p. 71 - 78. 食品科学工学会, つくば.
- 11) 沖智之・増田真美・古田収・西場洋一・須田郁夫 (2001) 紫サツマイモを原材料としたチップスのラジカル消去活性. 食科工 **48** (12) : 926 - 932.
- 12) 寺原典彦・沖智之・松井利郎・福井敬一・杉田浩一・松本清・須田郁夫 (2007) 紫甘しょに含まれる主要アントシアニンの一斉定量. 食科工 **54** (1) : 33 - 38.
- 13) 澤井祐典・菅原晃美・沖智之・西場洋一・氏原邦博・須田郁夫 (2012) 紫黒米・黒大豆のアントシアニン分析における高速液体クロマトグラフィーと pH differential 法の比較. 食科工 **59** (2) : 104 - 108.
- 14) 網本邦広・山崎明子・所勝利・工藤りか・福井宏至 (1996) 化学育種を目的とする野菜の成分分析 (第 1 報) -レタス成分の品種間比較-. 植物工場学会誌 **8** (3) : 146 - 153.
- 15) 上江洲榮子・山口春奈・石川香織・玉城優子・崎浜美智子・内間ゆかり・山川房江 (2005) 沖縄県で入手可能な野菜の抗酸化力: エタノール抽出について. 琉球大学教育学部紀要 **67** : 215 - 229.
- 16) 吉川直樹・天野耕二・島田幸司 (2006) 野菜の生産・輸送過程における環境負荷に関する定量的評価. 環境システム研究論文集 **34** : 245 - 251.
- 17) オールガイド五訂増補食品成分表 (2008) 実教出版: pp. 82 - 113.
- 18) Llorach, R., Martinez-Sanchez, A., Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Ferreres, F. (2008) Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* **108** (3) : 1028 - 1038.
- 19) Caldwell, C. R. (2003) Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **51** (16) : 4589 - 4595.
- 20) Ferreres, F., Gil, M. I., Marisol Castañer, M., and Tomás-Barberán, F. A. (1997) Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *J. Agric. Food Chem.* **45** (11) : 4249 - 4254.
- 21) 横塚弘毅・松土俊秀・奥田徹・高柳勉 (2001) フォーリン・シオカルト法を用いた逆相系高速液体クロマトグラフィーによるフェノール化合物の分析—フェノールとフォーリン・シオカルト試薬との反応条件の至適化. *J. ASEV Jpn* **12** (1) : 21 - 28.
- 22) 加藤千香子 (2007) 栄養塩分析とそのための標準液の現状. 産総研計量標準報告 **6** (3) : 165 - 179.
- 23) Banerjee, S. K., Bonde, C. G. (2011) Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa Spreng* Bark: Impact of dielectric constant and geographical location. *J. Med. Plants Res.* **5** (5) : 817 - 822.
- 24) Burstein, S. (1953) Reduction of phosphomolybdic acid by compounds possessing conjugated double bonds. *Anal. Chem.* **25** (3) : 422 - 424.
- 25) Sun, M., Sakakibara, H., Ashida, H., Danno, G., Kanazawa, K. (2000) Dietary antioxidants fail in protection against oxidative genetic damage in *in vitro* evaluation. *Biosci Biotechnol Biochem.*

- 64 (11) : 2395 - 2401.
- 26) Sroka, Z., Cisowski, W. (2003) Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, **41** (6) : 753 - 758.
- 27) 須田郁夫・増田真美・古田収・西場洋一・沖智之・小林美緒 (2005) 黒大豆に含まれる代表的な抗酸化性成分の DPPH ラジカル消去活性. 九州農業研究 **65** : 55.
- 28) 澤井祐典 (2007) NMR による茶成分の抗酸化機構の解析—安定ラジカルとポリフェノール類との反応—. 野菜茶業研究所研究報告 **6** : 23 - 58.
- 29) 渡辺純・沖智之・竹林純・山崎光司・津志田藤二郎 (2009) 食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して. 化学と生物 **47** (4) : 237 - 243.
- 30) 木村英生・長沼孝多・小嶋匡人・小松正和・恩田匠・辻政雄 (2008) 山梨県産果実の総ポリフェノール含量とその DPPH ラジカル消去活性. 山梨県工業技術センター研究報告 **22** : 59 - 63.
- 31) 柴田圭子・渡邊容子・根岸由紀子・安原安代 (2005) サツマイモのクロロゲン酸誘導体および DPPH ラジカル捕捉活性に及ぼす加熱調理の影響. 日本調理科学会誌 **38** (4) : 324 - 332.
- 32) 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 (2005) 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. 食科工 **52** (10) : 462 - 471.
- 33) 桜井信子・飯塚徹・中山繁樹・船山浩子・野口万里子・永井正博 (2003) キクニガナ及びスギナより得られたカフェー酸エステルの血管平滑筋弛緩作用. 薬学雑誌 **123** (7) : 593 - 598.
- 34) Maeda, G., Takara, K., Wada, K., Oki, T., Masuda, M., Ichiba, T., Chuda, Y., Ono, H., Suda, I. (2006) Evaluation of antioxidant activity of vegetables from Okinawa prefecture and determination of some antioxidative compounds. *Food Sci. Technol. Res.* **12** (1) : 8 - 14.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Components of Leaf Lettuce

Yusuke Sawai[§], Tomoyuki Oki, Yoichi Nishiba, Shigenori Okuno, Ikuo Suda¹⁾ and Yoichi Yamato²⁾

Summary

Polyphenol contents and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of red- and green-leaf lettuce were measured. Total polyphenol contents and DPPH radical scavenging activities of red-leaf lettuce exceeded those of green-leaf lettuce. HPLC analysis indicated that the major polyphenol constituent of green-leaf lettuce was chicoric acid, and those of red-leaf lettuce was chicoric acid, chlorogenic acid, and quercetin-3-malonylglucoside. Polyphenol contents (gallic acid eq.) and DPPH radical scavenging activities of authentic samples of chicoric acid, chlorogenic acid, and rutin (quercetin-3-rutinoside), as a model compound of quercetin-3-malonylglucoside, were also investigated, and their activities on leaf lettuce were discussed. The major contributors to DPPH radical scavenging activity were found to be chicoric acid in green-leaf lettuce, and chicoric acid, quercetin-3-malonylglucoside, and chlorogenic acid in red-leaf lettuce.

Key words : plant factory, leaf lettuce, polyphenol, chicoric acid, chlorogenic acid, quercetin - 3 - malonylglucoside, antioxidant activity.

Crop and Agribusiness Research Division, NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, Suya 2421, Koshi, Kumamoto 861 - 1192, Japan

1) Retired, NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center

2) Lowland Farming and Horticulture Research Division, NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center