農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

産地および収穫時期の違いがホウレンソウ・小松菜・トマト・キュウリの抗酸化能に及ぼす影響

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2019-12-20
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 若木, 学, 渡辺, 純, 石川（高野）, 祐子
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002930

技術報告

産地および収穫時期の違いがホウレンソウ・小松菜・トマト・キュウリの抗酸化能に及ぼす影響

若木　学，渡辺　純，石川（高野）祐子[§]

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所

Effects of producing area and harvest season on antioxidant capacites of spinach, komatsuna, tomato, and cucumber.

Manabu Wakagi, Jun Watanabe, Yuko Takano-Ishikawa[§]

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

Abstract

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) is a method for evaluating antioxidant capacities of both hydrophilic compounds (H-ORAC) and lipophilic compounds (L-ORAC). In this study, we evaluated antioxidant capacities of four vegetables (spinach, komatsuna, tomato, and cucumber) from different season and regions using ORAC methods. H-ORAC values of spinach, komatsuna, tomato, and cucumber ranged from 915.2 to 3302.7 μmol Trolox equivalent (TE)/100 g fresh weight (FW), 517.5 to 2312.2 μmol TE/100 gFW, 264.0 to 491.7 μmol TE/100 g FW, and 152.8 to 265.7 μmol TE/100 g FW, respectively. L-ORAC values of them ranged from 545.0 to 1387.3 μmol TE/100 g FW, 186.8 to 827.8 μmol TE/100 gFW, 27.6 to 55.7 μmol TE/100 g FW, and 97.0 to 182.4 μmol TE/100 g FW, respectively. Differences in their H-ORAC values were observed among producing area. H-ORAC values of cucumber harvested in summer were higher than in winter, whereas that of spinach harvested in summer was lower than in winter. Neither producing area nor harvest time affected their L-ORAC values under this experimental condition. Therefore, it is suggested that producing area and harvest time are important factors in antioxidant capacities of vegetables.

Keywords: 抗酸化能，H-ORAC（親水性−酸素ラジカル吸収能），L-ORAC（親油性−酸素ラジカル吸収能）

[§] 連絡先（Corresponding author），yuko@affrc.go.jp

緒　言

スーパーオキシドラジカルや一重項酸素などの活性酸素種は，病原体排除機構をはじめとする生体防御に関わるなど，健康維持に重要な役割を果たしている．また，生体内には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も備わっており，バランスが保たれている[1]．しかしながら，喫煙等の生活習慣や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ると，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，遺伝子障害を起こし，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，生体に備わった防御機構に加え，食事由来の抗酸化物質の摂取が健康維持に重要と考えられている．

食品成分の抗酸化作用機構は，直接的に活性酸素種を消去する作用と生体内における酸化ストレス防御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がある．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（酸素ラジカル吸収能：ORAC）法は，ラジカル発生剤2, 2' -azobis（2-amidinopropane）dihydrochloride（AAPH）を用いてペルオキシル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できるlipophilic-ORAC（L-ORAC）法がある．H-ORAC原法は，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]．

ORAC法は比較的簡便な方法で，かつ多検体処理が可能であり，様々な研究報告において食品の抗酸化能評価に用いられてきた．例えば，Wuらはアメリカ合衆国内における100種類の食品に関して，季節や産地ごとの抗酸化能の評価を行った[4]．また，2007年にアメリカ合衆国農務省（USDA）は277種類の食品についてORAC値のデータベースを公表した．しかしながら，2010年に渡辺らが行った室間共同試験[5]の結果，H-ORAC原法は室間再現性が低く妥当性は確認できなかったことから，異なる試験室で測定したORAC値を元に食品の抗酸化能を単純に比較することはできない．その後，2012年に渡辺らにより改良されたH-ORAC改良法[6]では分析精度が向上し，室間共同試験によって妥当性も確認された．これにより初めて，異なる試験室で評価した食品の抗酸化能をORAC値により比較することやORAC値をデータベース化することが可能となった．また，L-ORAC法も同様に渡辺らにより測定方法[7]に改良が加えられ，単一試験室での測定精度が確認された．

本研究では，妥当性確認のなされたH-ORAC改良法ならびに室間共同試験による妥当性確認試験を行っているL-ORAC改良法を用いて野菜の抗酸化能を測定し，産地および収穫時期による変動を比較検討することを目的とした．その結果，野菜によっては産地によってH-ORAC値が異なることや収穫時期によってH-ORAC値が大きく変動することを見出したので報告する．

実験材料及び方法

1．供試野菜試料

市販野菜４品目（ホウレンソウ，小松菜，トマト，キュウリ）を対象に，2012年６月から2013年２月の間，茨城県土浦卸売市場において入手可能な産地のものを毎月購入した．ホウレンソウおよび小松菜は，150-200 g/ 束の５束から根部等の非可食部を除いた部分を2−3 cm程度に切ってよく混合し，200 g程度を取り測定試料とした．トマトは平均的な大きさの５個を選んでへたを取り，可食部を縦に４分割し，対角上の２カ所を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た．キュウリは６本から１cm幅に横断したものを３カ所おきに採取，さらに裁断してよく混合し，200 g程度を取り測定試料とした．それぞれ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 μm粒度まで粉砕し，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℃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），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．ORAC法による野菜の抗酸化能評価

野菜凍結乾燥粉末約１gを精秤し，海砂と混合した．高速溶媒抽出装置（ASE-350: Dionex）を用いて，n-ヘキサン：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，1500 psiの圧力で60秒間パージを４回繰り返す）[4]．その後，引き続きMWA溶媒（メタノール：水：酢酸＝90：90：9.5：0.5）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，1500 psi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，親油性画分および親水性画分はそれぞれ，測定まで-80℃で保存した.

L-ORAC測定：得られた親油性画分を窒素気流下で乾固した後，DMSO（５mL）で再溶解した．DMSO溶液は７％（w/v）メチル−β−サイクロデキストリンの50％アセトン溶液で適宜希釈し，渡辺らの方法[7]に従ってL-ORAC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をPowerscan HT（DSファーマバイオメディカル）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（μmol TE/100 g FW）として示した.

H-ORAC測定：得られた親水性画分をMWA溶媒で50 mLに定容した．これを75 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）で適宜希釈して，渡辺らの論文[6]に記載されている方法に従ってH-ORAC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（μmol TE/100 g FW）として示した.

３．統計処理

野菜の抽出は２回行い，各抽出液について各測定を２反復で行っており，ORAC値は平均値±標準偏差として表した．ヒストグラムの階級数および範囲は，スタージェスの公式を用いて決定した.

実験結果および考察

１．野菜のH-ORAC値およびL-ORAC値の分布

野菜の抗酸化能について基礎的な知見を得るために，品目ごとに得られた野菜のH-ORAC値（図１）およびL-ORAC値（図２）のヒストグラムを作成した．H-ORAC値の範囲は，ホウレンソウが918.2から3302.7 μmol TE/100 g FW，小松菜が517.5から2312.2 μmol TE/100 g FW，トマトが264.0から491.7 μmol TE/100 g FW，キュウリが152.8から265.7 μmol TE/100 g FWだった（図１）．それぞれ最小値と最大値にはおおよそ２から４倍の差が認められた．また最も高い階級にあったのは，ホウレンソウでは１月の宮城県産，小松菜では１月の埼玉県産，トマトでは10月の栃木県産，キュウリでは７月の広島県産と９月の福島県産であった．L-ORAC値の範囲は，ホウレンソウが545.0から1387.3 μmol TE/100 g FW，小松菜が186.8から827.8 μmol TE/100 g FW，トマトが27.6から55.7 μmol TE/100 g FW，キュウリが97.0から182.4 μmol TE/100 g FWであり（図２），それぞれ最小値と最大値にはおおよそ２から４倍の差があることが認められた．また最も高い階級にあったのは，ホウレンソウでは１月の宮城県産，小松菜では６月の茨城県産，トマトでは９月および10月の茨城県産，キュウリでは７月の岩手県産であった．以上の結果より，抗酸化能の高い階級にある野菜の収穫時期がほぼ同一であることが示唆された.

２．産地による野菜の抗酸化能に及ぼす影響

産地による野菜の抗酸化能に及ぼす影響を検討するために，産地別に野菜のH-ORAC値およびL-ORAC値を示した（図３）．トマト，およびキュウリは６月から８月の間に入手したものを，ホウレンソウ，および小松菜については９月から11月の間に入手したものを使用した．この時期はいずれの品目も最も出荷量が多いため，産地ごとの差異を検討するのに適していると考えられた.

この期間におけるホウレンソウのH-ORAC値は915.2±549.4から2816.4±983.4 μmol TE/100 g FWの範囲で，最も値の高かった県は群馬県，最も低かったのは岩手県であり，産地間で約３倍の差が認められ

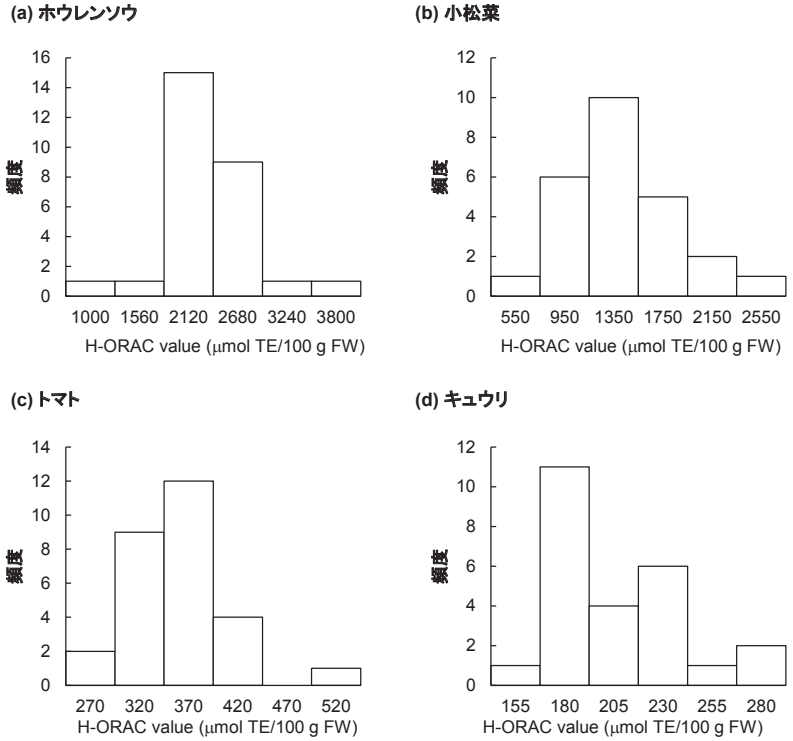

図１．野菜のH-ORAC値の分布

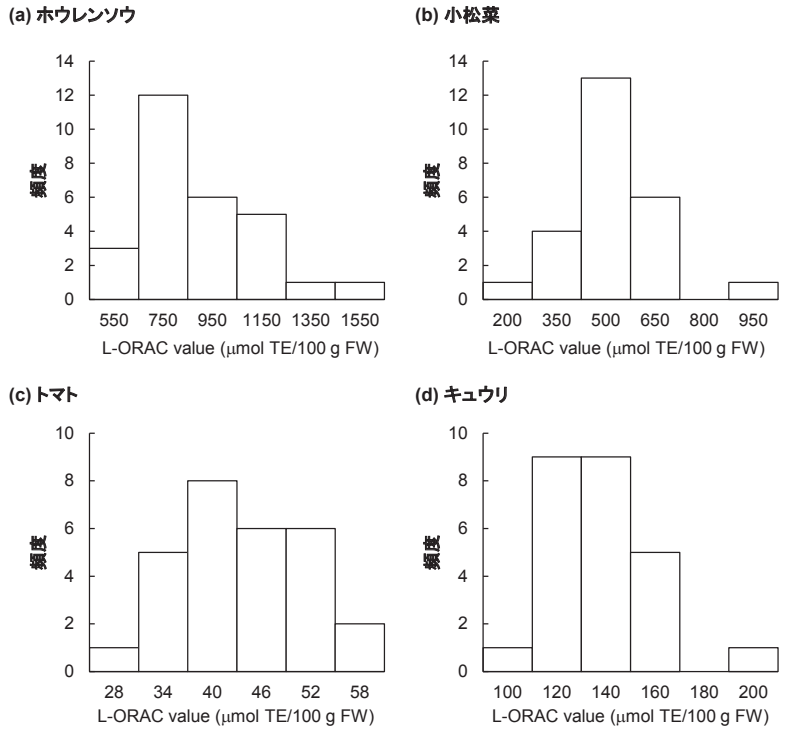

図２．農作物のL-ORAC値の分布

た（図 3a）．小松菜のH-ORAC値は818.0 ± 336.3から1300.1 ± 459.9 μmol TE/100 g FWの範囲で，茨城県が最も高く，群馬県が最も低かった（図 3b）．トマトは産地によるH-ORAC値の差はほとんどなく，いずれの産地も300 μmol TE/100 g FW前後の値を示した（図 3c）．キュウリのH-ORAC値は188.4 ± 134.1から265.7 ± 130.0 μmol TE/100 g FWの範囲で，最も値が高かった県は広島県で，最も低かった県は茨城県であった（図 3d）．一方，L-ORAC値に関しては，すべての野菜において産地間での差はほとんど認められなかった．

本研究の結果より，産地の違いは野菜のH-ORAC値に大きな影響を与えるが，L-ORAC値は産地による変動はほとんどないことが明らかになった．すなわち，産地によって親水性の抗酸化物質量は変化するが，親油性の抗酸化物質の量への産地の影響は少ないと考えられた．

３．収穫時期による野菜の抗酸化能に及ぼす影響

次に，収穫時期による野菜の抗酸化能に及ぼす影響を検討するために，2012年６月から2013年２月の間に入手した野菜のH-ORAC値およびL-ORAC値を測定し，月ごとにプロットした（図４および５）．キュウリは，７月が最もH-ORAC値が高く224.8 ± 50.2 μmol TE/100 g FWで，最も低かったのが１月で168.4 ± 14.8 μmol TE/100 g FWであった（図 4d）．L-ORAC値に関しても同様に，７月が最も高く144.5 ± 30.3 μmol TE/100 g FWで，最も低かったのが12月で104.6 ± 9.9 μmol TE/100 g FWであった（図 5d）キュウリの抗酸化能は収穫時期に大きく影響を受けており，寒冷期において低くなる傾向があった．一方，ホウレンソウは逆の傾向を示しており，１月が最もH-ORAC値が高く2658.2 ± 542.9 μmol TE/100 g FWで，最も低かったのが９月で2658.2 ± 542.9 μmol TE/100 g FWであった（図 4a）．小松菜およびトマトに関しては，H-ORAC値およびL-ORAC値いずれにおいても明確な季節変動は認められなかった（図４および５）．以上の結果より，収穫時期は野菜の抗酸化能に影響を及ぼすことが分かった．また，同じ収穫時期であっても野菜のH-ORAC値のばらつきは大きく，この理由としては前項のように産地が抗酸化能変動の一要因であることが考えられた．L-ORAC値は，いずれの野菜においてもH-ORAC値と同様の傾向を示したが（図５），その変動幅はH-ORAC値に比べて小さかった．本研

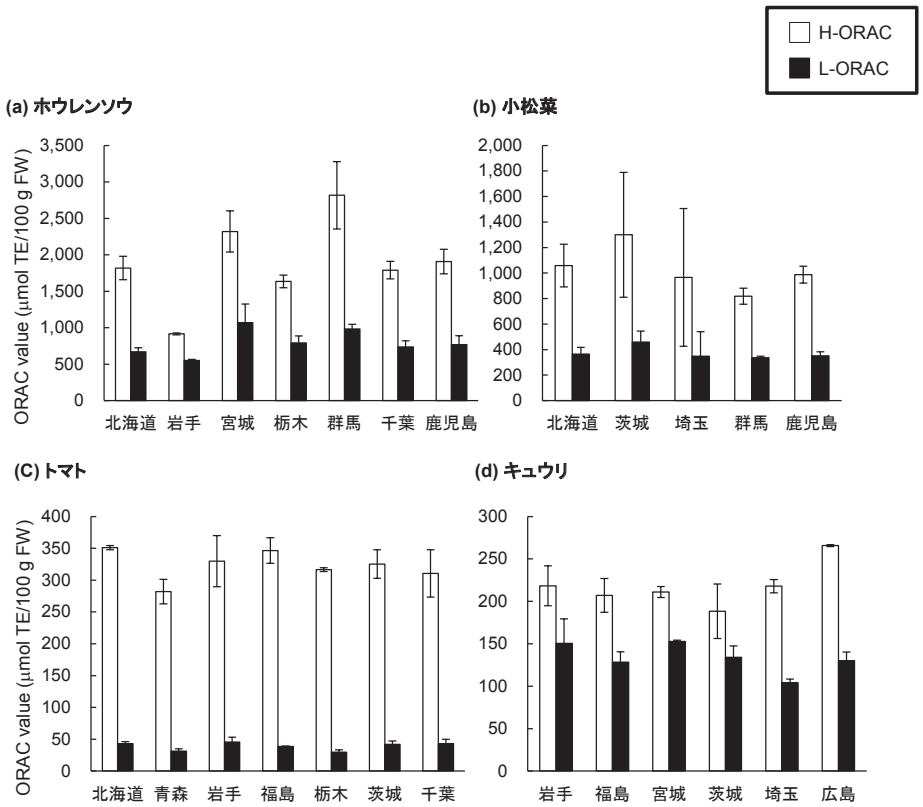

図３．産地による野菜の抗酸化能に及ぼす影響

究の結果より，４種の野菜の抗酸化能は産地および収穫時期により影響されること，またその変動の主な原因は親水性の抗酸化物質量の違いであることが分かった．L-ORAC値は，いずれの野菜においてもH-ORAC値と同様の傾向を示したが（図５），その変動幅はH-ORAC値に比べて小さかった．本研究の結果より，野菜の抗酸化能は産地および収穫時期により影響されること，またその変動の主な原因は親水性の抗酸化物質量の違いであることが分かった．

本研究では一般流通している野菜を対象にして，産地および収穫時期による野菜の抗酸化能に及ぼす影響について検討を行った．その結果，野菜のH-ORAC値，すなわち親水性抗酸化物質は産地や収穫時期によって影響されることを見いだした．また，親油性抗酸化物質より親水性抗酸化物質の方が野菜の抗酸化能の寄与率が高いことが分かった．しかしながら本研究では，野菜の品種，栽培条件，または貯蔵方法などの条件は考慮にいれておらず，これらも野菜の抗酸化能に寄与することが考えられるため，今後の研究課題としたい．

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法を用いて，産地および収穫時期によるホウレンソウ，小松菜，トマト，およびキュウリ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，産地および収穫時期は上記野菜の親水性抗酸化物質量に影響を及ぼすことを明らかにした．

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)

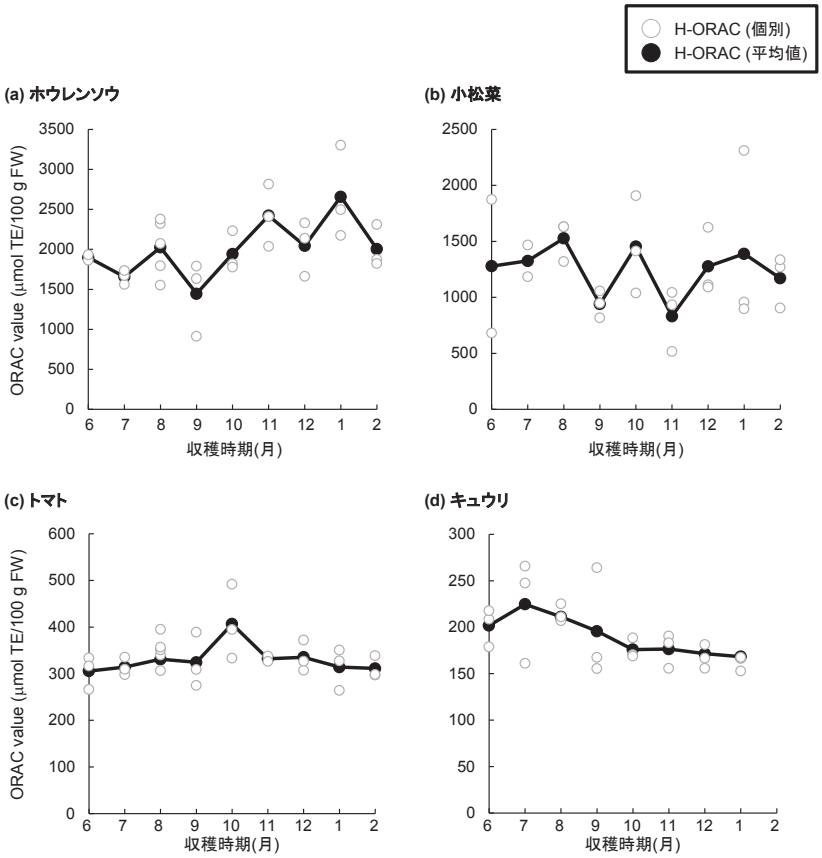

図４．収穫時期による野菜のH-ORAC値に及ぼす影響

2）Ou, B., Hampsch-Woodill, M., and Prior, R.L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric.Food Chem.*, **49**, 4619-4626 (2001)

3）Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K., Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1815-1821 (2002)

4）Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., and Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026-4037 (2004)

5）渡辺純，沖智之，竹林純，山崎光司，津志田藤二郎：抗酸化能測定法であるH-ORAC法の室間共同試験．日本食品科学工学会誌，**57**，525-531（2010）

6）Watanabe, J., Oki, T., Takebayashi, J., Yamasaki, K., Takano-Ishikawa, Y., Hino, A., 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)

7）Watanabe, J., Oki, T., Takebayashi, J., Yamasaki, K., Takano-Ishikawa, Y., Hino, A., Yasui, A., Improvement of the lipophilic-oxygen radical absorbance capacity (L-ORAC) method and single-laboratory validation. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **77**, 857-859 (2013)

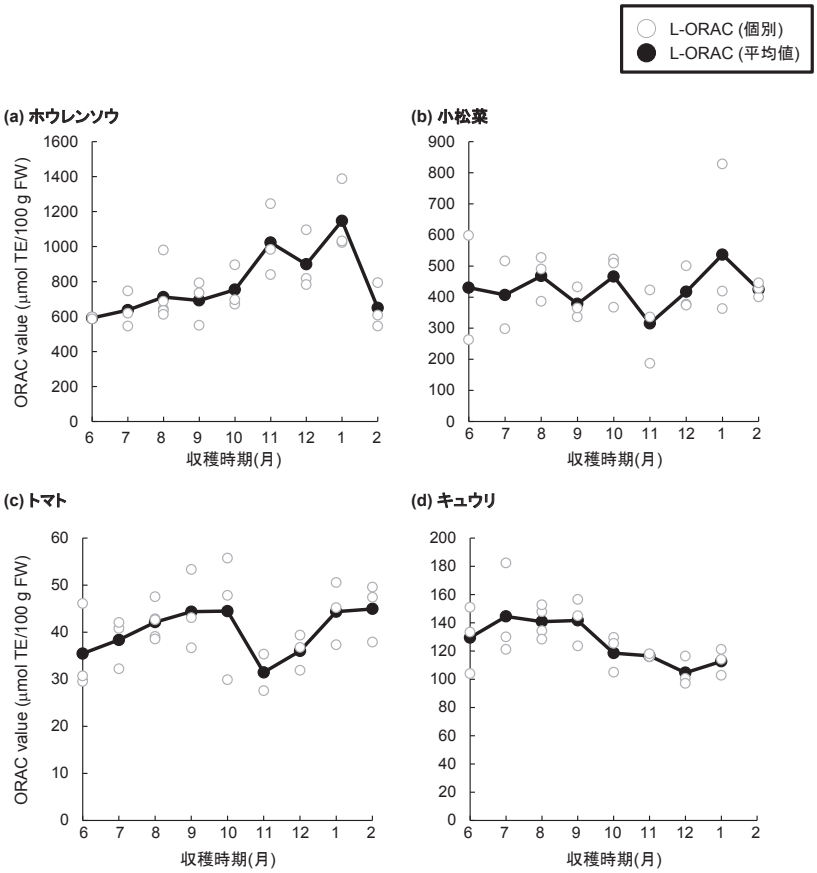

図５．収穫時期による野菜のL-ORAC値に及ぼす影響