

菱の抗酸化性について

熊川景子・安田みどり・尊田民喜・近藤道男

(西九州大学 健康福祉学部 健康栄養学科)

(平成16年12月2日受理)

Study on Antioxidative Activity of Hishi (Water Chestnuts)

Keiko KUMAGAWA, Midori YASUDA, Tamiyoshi SONDA and Michio KONDO

(Department of Health and Nutrition Sciences, Faculty of Health and Social Welfare Science, Nishikyushu University)

(Accepted December 2, 2004)

Abstract

Antioxidative activity of “Hishi (Water chestnuts)” which are famous natural products in Saga and Kurume areas, was examined by oxygen electrode method. The high antioxidative activity found to be in the extracts from crusts of Hishi and the activity proved of almost same value as that of green tea. Under the optimum extracted condition (pH 2.0 and 60 % methanol aqueous solution), the active compounds were obtained from dried materials of crusts. Further separation of the compounds with ethyl acetate, aqueous solution at pH 7.0 and pH 2.0 gave three components (A, B and C). The component B showed among the highest antioxidative activity and characteristic UV spectrum, and the data indicated that the B contains useful polyphenol compounds.

Key words : Hishi 菱

Antioxidative activity 抗酸化性

polyphenol compounds ポリフェノール化合物

1. 緒言

菱はヨーロッパおよびアジアの温帯地方に広く分布し、アジアでは中国大陸、台湾、朝鮮半島および日本列島の池や沼に野生している。世界では5種類以上あると言われ、わが国ではヒシ (*Trapa japonica*)、オニビシ (*Trapa japonica* var. *rubeola*)、ヒメビシ (*Trapa incisa*) が一般に知られている¹⁾。

菱は平坦部に散在するクリークに自生して、その実を食用として9月中旬から10月下旬にかけて収穫されている。最近では農業の兼業化に伴い、菱への関心が薄れてきたことやクリークが雑草に覆われて泥土で埋まり、その生育場所を失ったことで、その分布は減少している²⁾。しかし、一方でハンギーと呼ばれるタライに乗って採取するという珍しい採取方法がマスメディアで報道され、全国的にも知られる食物となってきている。

昔から菱は癌や婦人病、胃腸病、便秘、糖尿病などに効用があると言われ、煎じて飲用する習慣がある³⁾。また、菱の渋みから菱中には緑茶などに多く含まれているカテキン類などのポリフェノール化合物の存在が予想される。

菱に関する研究は、生育・収穫調査²⁾や栽培方法²⁾⁴⁾、そして炭水化物などの一般成分の分析²⁾⁵⁻¹¹⁾についての報告はあるものの、生理活性機能に関する報告はほとんどない。そこで、本研究では、菱の抗酸化性を調べることを目的とした。また、抗酸化性を最も強く示す成分の抽出条件についても検討を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

佐賀県神埼郡千代田町で栽培されたヒシ (*Trapa japonica*)、福岡県大木町で栽培されたオニビシ (*Trapa japonica* var. *rubeola*) を用いた。

対照試料として、市販の緑茶 (嬉野茶) を用いた。

2.2 試料の調製

菱は採取後、実と皮に分け、水にて洗浄を行った。その後、40℃で48時間乾燥 (加熱乾燥法)、または凍結乾燥 (LABCONCO) にて12時間凍結乾燥を行った。乾燥後、ミルサーにて、均一の粉末状にした。

2.3 実験方法

2.3.1 抽出方法

(1) 熱水抽出法

褐色びんに粉碎した乾燥試料0.1gと80℃の熱水8mlを加え、80℃の恒温槽でスターラーを用いて攪拌しながら、30分間抽出した。これを流水で冷やし、10ml容メスフラスコにて定容した。さらに、ねじ

口試験管に移し、遠心分離 (3000回転、5分間) を行い、上澄み液を0.45μmメンブランフィルター (13HP045AN, ADVANTEC) にてろ過したものを窒素充填後、冷凍保存 (-18℃) した。なお、遠心分離には久保田製作所製5100を用いた。

(2) 超音波抽出法

10ml容メスフラスコに試料0.1gと溶媒8mlを入れ、超音波抽出を1時間行ったものをそれぞれの溶媒で定容した。さらに、ねじ口試験管に移し、遠心分離 (3000回転、5分間) を行い、上澄み液を0.45μmメンブランフィルターにてろ過したものを窒素充填後、冷凍保存 (-18℃) した。

2.3.2 抗酸化性の評価方法

抗酸化性の評価は酸素電極装置 (オキシグラフ8型、セントラル科学) により行った¹²⁾。0.5Mのドデシル硫酸ナトリウムを含む50mMリノール酸溶液 (pH7.4) 1.2mlを37℃の恒温水を循環して保温した酸素電極用密閉セルに入れ、マグネチックスターラーで、溶存酸素量が7.0mg/lに安定するまで攪拌し、安定後、試料抽出溶液10μlを加え、直ちに酸化開始剤として1M 2,2'-アゾビス (2,4-ジメチルバレロニトリル (AMVN)) メタノール溶液を加えて、セルに接続した酸素電極によって溶存酸素量を計時的に測定した。

2.3.3 総ポリフェノールの定量

総ポリフェノールはFolin-Denis改良法¹³⁾により測定した。熱水抽出溶液0.2mlに2%炭酸ナトリウム4mlを加え、2分後、2倍希釈したフェノール試薬0.2mlを加えた。その後30分間室温放置し、吸光度 (750nm) を測定した。標準溶液として (+) -カテキン (フナコシ株式会社) を用いて検量線を作成し、総ポリフェノール含量を求めた。

2.3.4 抽出溶液の分画方法

抗酸化性評価の結果とGhiselliらの方法¹⁴⁾よりFig. 1の分画方法にて抽出を行った。まず、菱の皮の乾燥試料50gに500mlの60%メタノール-5%ギ酸水溶液 (pH2) を加え、1時間超音波にて抽出した後、吸引ろ過を行った。続いて、エバポレーターにてメタノールを除去した抽出溶液に同量の酢酸エチルを加え、振とう機 (井内製 AS-1) にて30分間振とうし、この操作を3回繰り返す。そこで得られた水相を抽出溶液Aとした。有機相はエバポレーターにて蒸発させ、残った固形物を水に溶かし、0.1M水酸化カリウムでpH7に調整後、酢酸エチルを加え、30分間振とうした (同様の操作を3回繰り返した)。そこで得られた有機相を抽出溶液Bとし、5%ギ酸水溶液でpH2に調整し

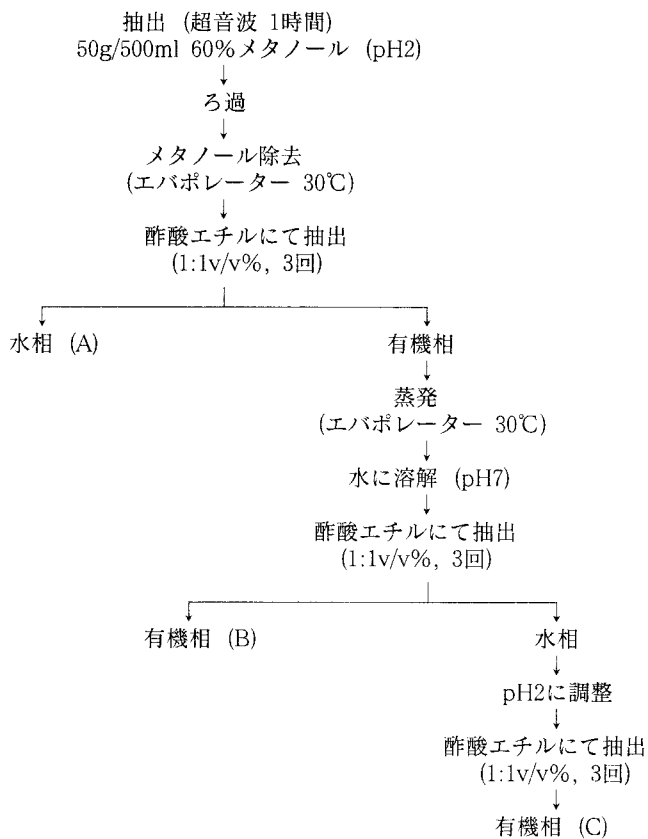


Fig. 1 抽出溶液の分画方法

た水相に、さらに酢酸エチルを加え、30分間振とうした（同様の操作を3回繰り返した）。そこで得られた有機相を抽出溶液Cとした。

3. 結果および考察

3.1 菱の種類と部位別の抗酸化性の比較

菱（実および皮）と緑茶の抗酸化性の評価をFig. 2に示す。横軸は抗酸化性を示す尺度であり、低い値ほど抗酸化性が高いことを示している。 $R_p'/R_p < 1$ の

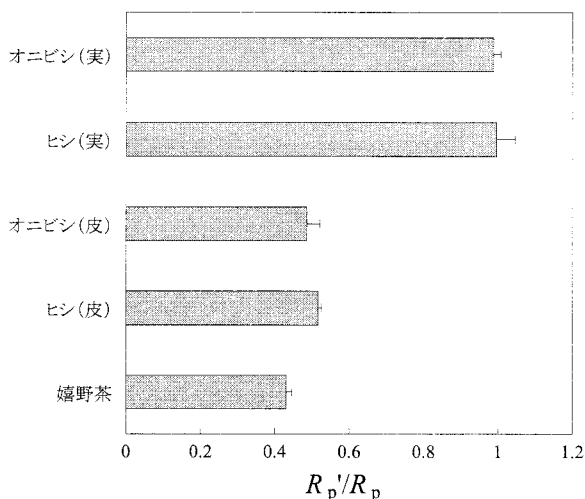


Fig. 2 菱の部位別および種類別による抗酸化性の比較

時、抗酸化性が認められたこととなる。なお、ここで用いた抽出溶液は加熱（40℃）乾燥試料を熱水抽出したものである。

オニビシ、ヒシともに菱の実にはほとんど抗酸化性がみられなかったが、菱の皮には強い抗酸化性が認められた。この結果より、菱の皮には、各種の種類の抗酸化物質、または緑茶に相当する抗酸化性の強い物質が存在していると考えられる。

3.2 ポリフェノール含量

菱の皮、実および比較として緑茶中の熱水抽出溶液の総ポリフェノール含量をFolin-Denis改良法¹³⁾により測定した結果、乾燥重量100 g当たり、ヒシの皮には7.46 g、オニビシの皮には11.1 g含まれていることが分かった。しかし、菱の実には、ヒシ、オニビシともにポリフェノールは全く含まれていなかった。なお、比較として緑茶中のポリフェノールについて調べたが、7.08 g/100 gであった。つまり、ヒシの皮には、緑茶と同等もしくは、それ以上のポリフェノールが含まれていることが明らかになった。なお、今後の実験では、最も高い抗酸化性を示し、最も多くのポリフェノールを含んでいたオニビシの皮を用いることとした。

3.3 抽出溶媒の検討

3.3.1 溶媒の影響

菱の皮の抗酸化性に与える抽出溶媒の影響を調べた。その結果をFig. 3に示す。疎水性（酢酸エチル、ヘキサン）と親水性（アセトニトリル、アセトン、エタノール、メタノール）の有機溶媒とを比較した場合、親水性の有機溶媒を用いた場合に強い抗酸化性が認められた。また、水を含まない溶媒よりも水を含んだ溶媒の方が強い抗酸化性が認められた。その中で最も抗酸化

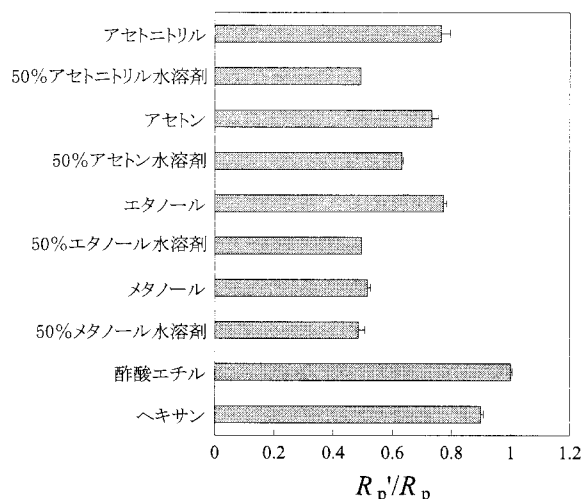


Fig. 3 菱の皮の抗酸化性に与える抽出溶媒の影響

性が強かったのは、50%メタノール水溶液であった。これらの結果より、菱に含まれる抗酸化物質は親水性を有する物質であることが分かった。

3.3.2 水-メタノール混合溶液の混合比の影響

前の実験で50%メタノール水溶液に最も高い抗酸化性が認められたことから、さらに水-メタノール混合溶液の混合比の影響を調べた。その結果をFig. 4に示す。実験の結果、いずれの濃度でも抗酸化は認められたが、メタノール濃度40%までは濃度が高くなるにつれ抗酸化力が強くなり、60%以上では抗酸化活性が低くなった。また、最も抗酸化力が強かったのは60%の濃度であったため、今後の実験の抽出溶媒は60%メタノール水溶液を用いることにした。

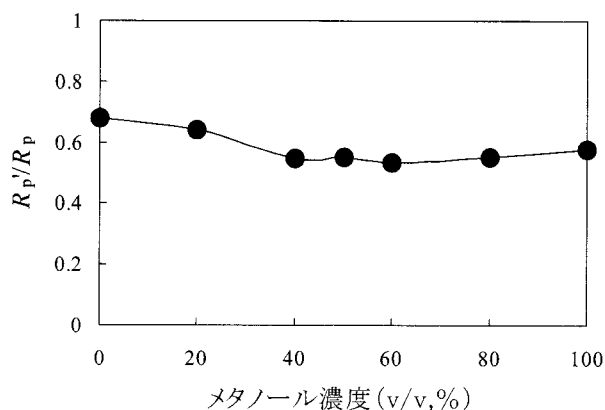


Fig. 4 水-メタノール溶液の混合比が菱の皮の抗酸化性に与える影響

3.4 乾燥方法の検討

乾燥方法の異なる試料を60%メタノール水溶液にて抽出を行ったときの抗酸化性を調べた結果をFig. 5に示した。乾燥方法の影響を検討した結果、いずれの方法においても同様の抗酸化性が認められた。その中でも特に加熱(40℃)乾燥したものに最も強い抗酸化性が認められた。従って、試料として、加熱(40℃)乾燥にて行ったものを用いた。

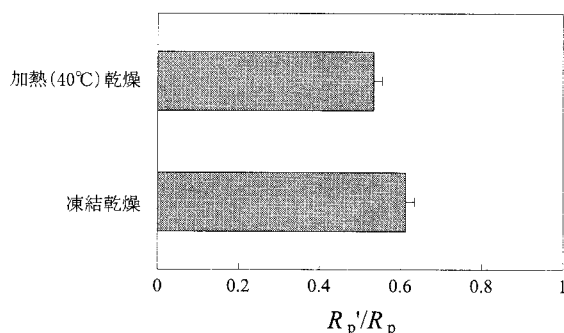


Fig. 5 乾燥方法の違いが菱の皮の抗酸化性に与える影響

3.5 pHの検討

抽出溶液のpHが菱の皮の抗酸化性に与える影響を調べた (Fig. 6)。pH 1から6まではほぼ一定の抗酸化性を示したが、pH 7付近からアルカリ性になるにつれ、抗酸化性は多少低くなった。これは、抽出溶液がアルカリ性になるとともに、試料中の成分が酸化されたと考えられる。従って、菱の皮に含まれる成分は、酸性溶液中で安定であると思われた。

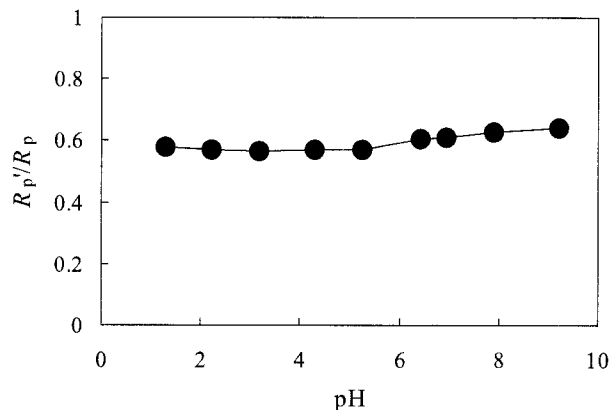


Fig. 6 菱の皮の抗酸化性に及ぼすpHの影響

3.6 菱の抽出溶液からの分画物の抗酸化性

抽出溶液A, B, Cの抗酸化性の評価を行った結果をFig. 7に示す。その結果、いずれの抽出溶液にも抗酸化性は認められ、その効力はA<C<Bの順であった。従って、抽出溶液Bに強い抗酸化物質があり、数種の抗酸化物質の存在が認められた。

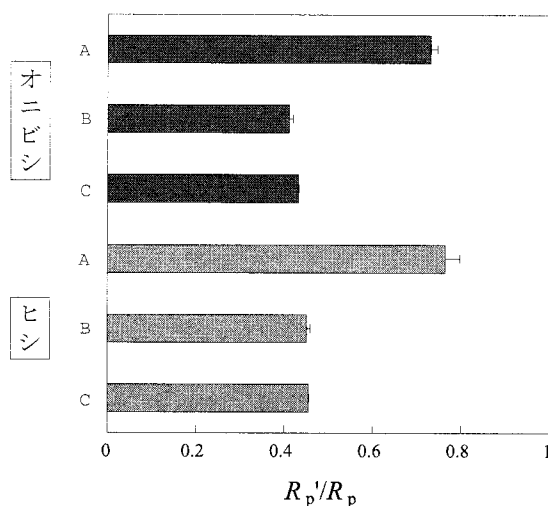


Fig. 7 菱の皮の抽出溶液の抗酸化性

また、UV吸収スペクトルの測定結果 (Fig. 8), 抽出溶液Aの極大吸収波長は531nm, Bは273nm, Cは270nmであった。これらのことより抽出溶液Aはアントシアニン類, 抽出溶液B, Cはフェノール類であることが示唆された。なお, Ghiselliらの結果¹⁴⁾とも一致した。

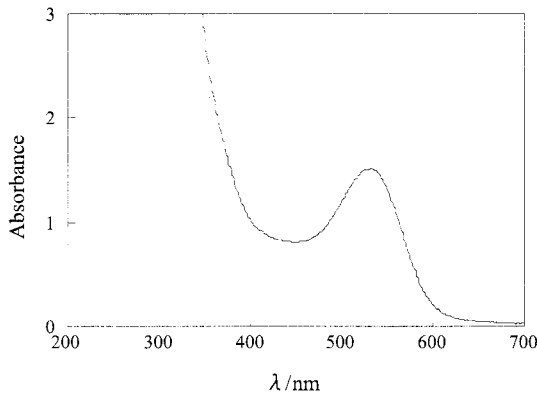


Fig. 8(a) 抽出溶液A (4倍希釈) の吸収スペクトル

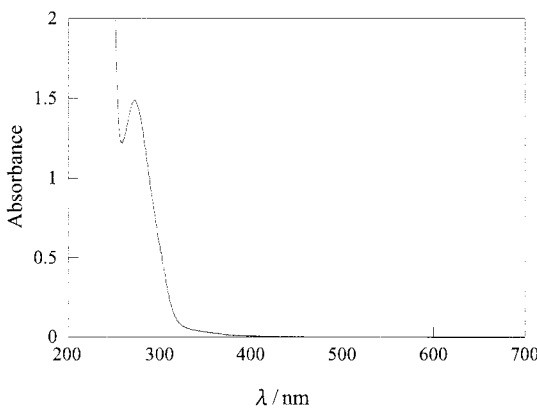


Fig. 8(b) 抽出溶液B (800倍希釈) の吸収スペクトル

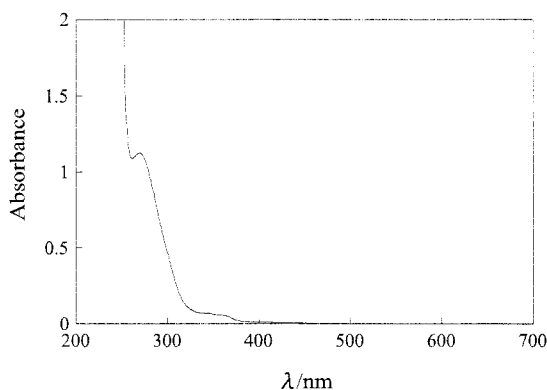


Fig. 8(c) 抽出溶液C (800倍希釈) の吸収スペクトル

4. 要 約

本研究では菱の抗酸化性について検討を行った。その結果、菱の実には抗酸化性はほとんど認められなかったが、菱の皮には強い抗酸化活性が認められた。なお、ヒシよりもオニビシの皮の方が強い抗酸化性を示した。

また、菱の皮の抗酸化性に与える乾燥方法や抽出溶媒およびpHの影響を調べた。その結果、菱の皮の抗酸化性は乾燥方法では加熱 (40℃) 乾燥法, 抽出方法では親水性の有機溶媒と水を含む溶液で抽出したものに最も高い活性が認められた。また、pHは酸性で安定した抗酸化性を示した。以上のことから、60%メタノール水溶液 (pH 2) の溶媒での抽出法が最適であることが分かった。

さらに3つの抽出分画A, B, Cに分け、それらの成分分画にはそれぞれ抗酸化性が認められた。その活性の強さはA<C<Bであった。成分分画Bは、強い抗酸化性をもち、UV吸収スペクトルの結果よりフェノール類であることが推察された。今後の研究により、この分画中の各成分の同定を行うことで、新たな生理活性成分の発見が期待できる。

5. 参考文献

- 1) 杉田浩一・堤忠一・森雅央:日本食品事典,135, (1994)
- 2) 百島敏男・中村大四郎:佐賀県農業試験場研究報告, 19, 83 (1974)
- 3) 近藤繁子:月刊東洋医学, **28**, 53 (2000)
- 4) H.T.Derigo and H.F.Winters: *Proc.Amer. Soc. Hort. Sci.*, **92**, 394 (1968)
- 5) Richard B: *J.Food Biochem.*, **17**, 85 (1993)
- 6) H.Tang, P.S.Belton, A.Ng and P.Ryden, *J. Agric.Food Chem.*, **47**, 510 (1999)
- 7) D.M.Klockeman, R.Pressey and J.J.Jen: *J. Food.Biochem.*, **15**, 317 (1991)
- 8) A.J.Parr, K.W.Waldron, A.Ng and M.L.Parker: *J Sci Food Agric.*, **71**, 501 (1996)
- 9) M.Bargale, N.J.Sawarkar and Y.K.Sharma: *The Ind J.Nutr & Dietet*, **24**, 78 (1987)
- 10) S.Hizukuri, Y.takeda, T.Shitaozono, J.Abe, A.Ohtakara, C.Takeda and A.Suzuki: *Star-ch/särke*, **40**, 165 (1988)
- 11) K.W.Waldron, M.L.Parker,A.Parr and A.Ng: *Spec.Publ.-R.Soc.Chem.*,**179**, 216 (1996).
- 12) M.Kumamoto and T.Sonda: *Biosci.Biotech. Biochem.*, **62**, 175 (1998)
- 13) 藤田修二・隈本みどり・尊田民喜・山本周人・林信行・石丸幹二:日本食品保蔵科学会誌, **25**, 99 (1999)
- 14) A.Ghiselli, M.Nardini, A.Baldi and C.Scaccini: *J.Agric.Food Chem.*, **46**, 361 (1998)