

# チャクチリソバの抗酸化性と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性に関する研究

目 黒 周 作

## I はじめに

近年、食の多様化や運動不足、不規則な食生活習慣などにより、肥満や高血圧、糖尿病さらに動脈硬化症などのいわゆる生活習慣病が増加し続け、社会的な問題となっている。これらを予防する様々な機能性成分を含有した食品などに注目集まっている。

シャクチリソバ (*Fagopyrum dibotrys* 英名 Perennial Buckwheat) は、主に中国、インド、ベトナム、タイ、ネパールなどでみられる植物でその根は昔から中国で民間薬として、肺の病気や赤痢、リウマチなどの治療に用いられてきた<sup>1)</sup>。シャクチリソバには、ルチンやケルセチンといったフラボノイドや様々なフェノール類が含有<sup>1) 2) 3)</sup> しており、その機能性が注目されている。その機能性が解明されることにより、日本であまり市場に出回っていないシャクチリソバの利用を拡大させ、様々な食品への応用できる可能性が高い。しかし、シャクチリソバの生活習慣病に対する機能性の研究は数が少ない。そこで本研究はシャクチリソバの機能性について抗酸化性と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害能について検討した。

## II 実験方法

### 試料の調整

シャクチリソバの実および根を凍結乾燥させ、ミルサーで細かく粉碎した。それぞれ0.5gずつ三角フラスコに秤とり、メタノールを100ml加え、冷却管をつけて80℃で60分還流加熱をした。次いで、脱脂綿を敷いたロートで濾

過し、濾液に活性炭を加えた。再び、濾過を行い、濾液をメタノールで250mlに定容したものを試験液とした。比較対照には市販の韃靼そば茶(東洋商事株式会社)を用いて同様に調整した。またシャクチリソバは平成26年に鯉淵学園農業栄養専門学校で栽培、収穫されたものを用いた。

### 機能性の評価

#### 1. DPPHラジカル消去活性

須田の方法<sup>4)</sup>を一部改変して行った。試験管に200 $\mu$ mol/L DPPH 600 $\mu$ l, 200mmol/L MES buffer (pH6.0) 300 $\mu$ l, 蒸留水 (DW) 300 $\mu$ l, 10倍希釈サンプル抽出液を添加し、暗室にて室温で反応させた。20分後、分光光度計にて520nmの波長における吸光度を測定した。コントロールとしてメタノールを用いて同様に操作を行った。また、それぞれの抽出液が吸光度測定に及ぼす影響を考慮するため、DPPH試薬を添加していないものをブランクとして値を補正した。還元能の評価は下記の式により算出した。また、抽出液を段階的に希釈し試験を行い、コントロールを100%とした場合、50%の抗酸化活性を示す濃度 {EC50:乾燥試料粉末 (g)} を算出した。

$$\text{抗酸化率} = \frac{\{\text{コントロール吸光度} - (\text{サンプル吸光度} - \text{ブランク吸光度})\}}{\text{コントロール吸光度}} \times 100$$

#### 2. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay

Pellegrini等の方法<sup>5)</sup>に従った。2, 2-azino-

bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)ラジカル陽イオンABTSストック溶液は、2.45mmol/L (終濃度) の過硫酸カリウム ( $K_2S_2O_8$ ) を含む7.0mmol/LのABTSストック溶液を暗所室温で16時間反応させて作製した。ストック溶液を743nmで $0.7 \pm 0.02$ の吸光度になるようにエタノールで希釈しABTS溶液とした。10倍希釈した試料 $50 \mu\text{l}$ をABTS溶液1.5mlと混合し室温で5分間反応後、試料によるABTS消去能を734nmの吸光度の変化から測定した。還元能の評価は下記の式により算出した。また、抽出液を段階的に希釈し試験を行い、コントロールを100%とした場合、50%の抗酸化活性を示す濃度 {EC50:乾燥試料粉末 (g)} を算出した。

抗酸化率 =  $\frac{\{\text{コントロール吸光度} - (\text{サンプル吸光度} - \text{ブランク吸光度})\}}{\text{コントロール吸光度}} \times 100$

### 3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

Benzie等の方法<sup>6)</sup>に従った。300mmol/L酢酸緩衝液 (pH3.6), 40mmol/L塩酸に溶解した10mmol/L 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ), 20mmol/L  $\text{FeCl}_3$ を10:1:1の割合で混合してFRAP試薬を調整した。試料 $100 \mu\text{l}$ にFRAP試薬3.0ml添加し、37°Cで4分間反応させ、3価鉄を2価鉄に還元力を593nmの吸光度で測定した。還元能の評価は下記の式により算出した。標準物質として $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を用いて結果を $\text{Fe}^{2+}$ 生成量 (mmol  $\text{Fe}^{2+}/100\text{ml}$ ) として示した。また、抽出液を段階的に希釈し試験を行い、吸光度0.4を100%とした場合、50%の抗酸化活性を示す濃度 {EC50:乾燥試料粉末 (g)} を算出した。

抗酸化率 =  $\frac{\{\text{コントロール吸光度} - (\text{サンプル吸光度} - \text{ブランク吸光度})\}}{\text{コントロール吸光度}} \times 100$

## 4. 糖質分解酵素阻害能の測定

### 4-1 ラット小腸由来マルターゼ阻害作用<sup>7)</sup>

ラット小腸アセトンパウダー粗酵素液 $300 \mu\text{l}$ , 74mmol/Lマルトース水溶液 $600 \mu\text{l}$ 及び0.1mol/Lリン酸緩衝液 (pH6.2), 各メタノール抽出液 $100 \mu\text{l}$ を混合し、37°Cで10分間反応した。のちに沸騰水中で2分間加熱し反応を停止させ、グルコースCIIテストワコーを用いて遊離グルコースを測定した。活性は以下の式にて算出した。

マルターゼ活性 (%)  
=  $\frac{(\text{サンプルブランク}) / \text{コントロール} \times 100}{\text{サンプル}}$   
サンプル: 試料を加えた場合の吸光度  
コントロール: 試料のかわりにメタノールを加えた場合の吸光度  
ブランク: 各々失活した酵素を加えて反応させた場合の吸光度

### 4-2 ラット小腸由来スクラーゼ阻害作用

ラット小腸アセトンパウダー粗酵素液 $300 \mu\text{l}$ , 148mmol/Lスクロース水溶液 $600 \mu\text{l}$ 及び1mol/Lリン酸緩衝液 (pH6.2), 各メタノール抽出液 $100 \mu\text{l}$ を混合し、37°Cで5分間反応した。のちに沸騰水中で1分間加熱し反応を停止させ、ソモギーネルソン法<sup>8)</sup>を用いて遊離還元糖を測定した。活性は以下の式にて算出した。

スクラーゼ活性 (%)  
=  $\frac{(\text{サンプルブランク}) / \text{コントロール} \times 100}{\text{サンプル}}$   
サンプル: 試料を加えた場合の吸光度  
コントロール: 試料のかわりにメタノールを加えた場合の吸光度  
ブランク: 各々失活した酵素を加えて反応させた場合の吸光度

## III 結果

機能性の評価

韃靼ソバ、シャクチリソバの実及びシャクチリソバの根抽出物の抗酸化活性の結果は表1に示した。

表1 韃靼ソバ、シャクチリソバの実、シャクチリソバの根抽出液の抗酸化活性

	抗酸化活性							
	DPPHラジカル消去活性			Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)		Ferric reducing antioxidant power (FRAP)		
	抗酸化率 (%)	相当量 <sup>1)</sup>	EC50 <sup>4)</sup>	抗酸化率 (%)	EC50 <sup>4)</sup>	抗酸化率 (%) <sup>2)</sup>	相当量 <sup>3)</sup>	EC50 <sup>4)</sup>
韃靼ソバ	39.4	4.0	0.54	3.3	2.5	60	104	0.38
シャクチリソバの実	54.7	5.6	0.26	10.2	1.2	74	259	0.31
シャクチリソバの根	95.8	9.9	0.015	87.4	0.1	80	1647	0.025

平均値

1) : Trolox nmol/L(n=5)

3) : mmol Fe<sup>2+</sup>/100ml(n=3)

2) : 吸光度0.7を100%とした相対値を基準(n=3)

4) : 乾燥試料粉末(g)

## 1 抗酸化活性

### 1-1 DPPHラジカル消去活性

シャクチリソバの実及び根ではそれぞれTrolox相当量として5.6nmol/L, 9.9nmol/Lであった。市販の韃靼ソバ茶と比較して特にシャクチリソバの根抽出物において2倍近い以上の値であった。抗酸化率ではシャクチリソバの根は95.8%と高い値を示した。また、EC50はそれぞれ、韃靼ソバでは0.54g, シャクチリソバの実では0.26g, シャクチリソバの根では0.015gで韃靼そばとシャクチリソバの実を比較すると約2倍、韃靼そばとシャクチリソバの根を比較すると36倍の抗酸化活性を示した。

### 1-2 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

シャクチリソバの実抽出液では比較対照に用いた韃靼ソバに比べて3倍ほどの活性を示した。さらにシャクチリソバの実と根を比較すると抗酸化活性が10.2%と87.4%と根の方が特に強い活性を示した。EC50で比較すると、シャクチリソバの根が最も抗酸化活性が強く、韃靼ソバに対して25倍、シャクチリソバの実に対して約10倍の活性を示した。

### 1-3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

シャクチリソバの実及び根ではそれぞれ、Fe<sup>2+</sup>相当量として259mmol Fe<sup>2+</sup>/100ml, 1647mmol Fe<sup>2+</sup>/100mlと韃靼ソバに比べて強い抗酸化活性を示した。またEC50においてはDPPHラジカル消去試験やTEAC試験同様、シャクチリソバの根抽出物が韃靼ソバとシャクチリソバの実それぞれの10倍以上の特に強い抗酸化活性を示した。

## 2 糖質消化酵素阻害作用

### 2-1 マルターゼ阻害作用

韃靼ソバおよびシャクチリソバのマルターゼ阻害活性を測定したところ、韃靼ソバでは20%、シャクチリソバの実及び根では約30%の阻害がみられたが、桑の葉と比較すると3分の1程度の阻害活性だった(図1)。

### 2-2 スクララーゼ阻害作用

スクラーゼ阻害活性を測定したところ、韃靼ソバ、シャクチリソバの実には阻害活性がほとんど見られなかったが、シャクチリソバの実において60%の阻害が確認された(図2)。

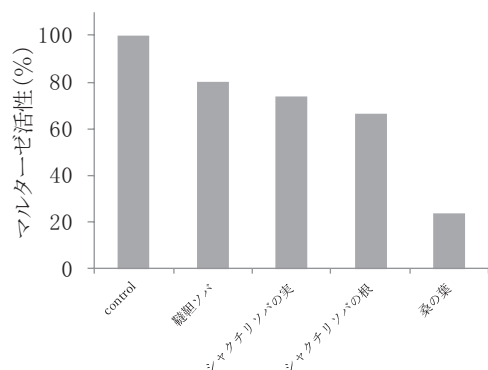


図1 ラット小腸由来マルターゼ阻害作用

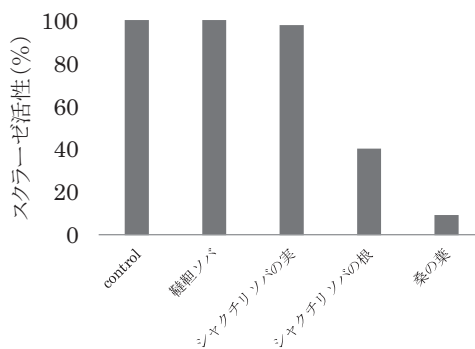


図2 ラット小腸由来スクラーゼ阻害作用

#### IV 考察

DPPHラジカル消去試験においてシヤクチリソバの根の60%アセトン抽出物の抗酸化活性が報告<sup>1)</sup>されている。今回新たに抗酸化活性試験としてTEAC法及びFRAP法の2つを行った。その結果、いずれの試験においても韃靼ソバと比較して高い抗酸化活性を有していることが確認された。シヤクチリソバの根抽出物では、特に強い抗酸化活性が示された。シヤクチリソバの根にはquecetinやgallic acidのような抗酸化活性を示す様々なポリフェノール<sup>1)</sup>が含有しており、TEAC法及びFRAP法においても強い抗酸化活性を示したと考えられる。また、フォーリンデニス法による総ポリフェノール量についてもそれぞれを比較した結果、シヤクチリソバの根抽出物においてタンニン酸換算 (mg/100ml) で10倍近いポリフェノール量を確認している (data not shown)。そのことから、含有するポリフェノールの量が抗酸化活性に関与していると考えられる。また、ラット小腸由来の $\alpha$ -glucosidase阻害活性については強い $\alpha$ -glucosidase阻害活性を有している桑の葉<sup>9)</sup>を比較対照に用いた。マルターゼ活性阻害については顕著な活性が示されなかったが、スクラーゼ活性阻害では、シヤクチリソバの根抽出物におい

て桑の葉に及ばないが60%の阻害と強い阻害活性を示した。今後、詳細について研究が必要である。以上の結果から、シヤクチリソバについて今後生活習慣病の予防に繋がるような機能性の可能性が示された。シヤクチリソバ、特に根茎についてはこれまで3-methylgossypetin-8-o- $\beta$ -D-glucopyranosideのように抽出物から精製・単離され構造が決定されている<sup>1)</sup>物質がいくつか報告されているが、生体内機能調節成分としてどのような働きがあるか詳細な報告はない。これらを含め今後、詳細な研究が必要である。

#### V 謝辞

本研究に用いたシヤクチリソバの実および根は鯉淵学園農業栄養専門学校にて栽培、採取されたものである。試料提供いただきました鯉淵学園農業栄養専門学校アグリビジネス科大熊准教授には心より感謝致します。

#### VI 文献

- 1) Wang, K.; Zhang, Y.; Yang, C. Antioxidant phenolic constituents from *Fagopyrum dibotrys*. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 99, 259-264
- 2) Bai, Z.Z.; Zhang, X.H.; Xuan, L.J.; Mo, F.K. A phenolic glycoside from *Fagopyrum dibotrys*.

- China J.Chin. Mater. Med.* 1997, 22, 743-745
- 3) Zhang,J.; Yin,Z.; Cao,P.; Li,Y.; Duan,J.A new flavonol derivative from *Fagopyrum dibotrys*. *Chemistry of Natural Compounds.* 2008, 44, 701-703
- 4) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野原修一 株式会社光琳, 食品機能研究法 pp.218-220 (2008)
- 5) Pellegrini,N., Re,R., Yang,M., and Rice - Evans,C.Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2-azinobis (3-ethyl ene benzothiazoline-6-sulfonicacid) radical cation decolorization assay, *Meth.Enzymol.*, 1999, 299, 379-389
- 6) Benzie,I.F.F., and Stain,J.J.Ferric reducing/ antioxidant power assay :Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, *Meth. Enzymol.*, 1999, 299, 15-27
- 7) 目黒周作 食品中に含有する $\alpha$ -glucosidase阻害活性物質の探索及びインビトロ消化法の確立に関する研究, 修士論文, 茨城キリスト教大学大学院生活科学研究科 (2015)
- 8) 上野川修一, 駒野徹, 志村憲助, 中村研三, 山崎信行 学会出版センター, 生物化学実験法1, 還元糖の定量法 (第2版), 9-11 (1998)
- 9) 木村俊之  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を有する桑葉の糖尿病予防食素材への可能性, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kai Shi*,57,(2),57-62(2010)

### Studies on the Constituents Relate Antioxidant and $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities in Extract of the Seed and Roots of Perennial Buckwheat

Shusaku Meguro

The antioxidant capacity of *Fagopyrum dibotrys* (*F. dibotrys*) (D.Don)Hara(Perennial buckwheat) seed and roots extract had been determined by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) assay and ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity using intestinal acetone powders from rat in vitro. The results showed that *F. dibotrys* seed extract of MeOH and *F. dibotrys* roots had good total antioxidant activity in vitro. According to these, the especially *F. dibotrys* roots extract of MeOH high antioxidant potential. The inhibitory activity of *F. dibotrys* seed extract of MeOH and *F. dibotrys* roots against maltase and sucrase from rat intestine was compared. *F. dibotrys* roots extract of MeOH is thought have inhibited sucrase activity.