

赤混黒米の色素の抗酸化性

Antioxidative Properties of the Pigment from Colored Rice (Akamajiri-kuromai)

磯部由香[§] 森岡めぐみ* 寺原典彦** 小宮孝志* 成田美代*

Yuka Isobe

Megumi Morioka

Norihiko Terahara

Takashi Komiya

Miyo Narita

The antioxidative activity of the crude pigment extracted from akamajiri-kuromai colored rice was measured by its suppressive activity toward the oxidation of linoleic acid, DPPH radical-scavenging activity, and OH radical-scavenging activity. The pigment extracted from akamajiri-kuromai exhibited higher antioxidative activity than the pigment extracted from red rice and black rice. The pigment of akamajiri-kuromai contained two components: the one fractionated from butanol was identified as Cy 3-Glc by HPLC and ¹H-NMR analyses, and the one fractionated from ethyl acetate seemed to be tannin.

キーワード: 赤混黒米 akamajiri kuromai; 黒米 Black rice; 色素 pigment; 抗酸化性 antioxidative property; アントシアニン anthocyanin

日本には、現在主として食されている白米のほかに、様々な有色米が栽培されている。黒米および赤米は赤飯の原形であるといわれており、この中のいくつかの種に関しては、歴史的な考察¹⁾、理化学的^{2,3)} および調理科学的性質⁴⁾ について報告されており、色素を利用した酒類についての研究も行われ^{5~7)}、実際に製造されているものもある。三重県では、通称「赤混黒米 (あかまじりくろまい)」と呼ばれる有色米が栽培されており、今回これを試料としてとりあげた。赤混黒米の外皮は黒い部分と茶褐色の部分で混ざっており、有色米の一種であると思われる。この米は個人的に中国から持ち帰り栽培されたものが伊勢神宮に奉納され、栽培されるようになったとされているが、詳細については不明である。平成2年頃から約10年間、明和町いつきのみや歴史体験館において、古代米の伝承を目的として、伊勢神宮から譲り受けた赤混黒米についての栽培が行われていたが、利用法の確立がなされなかったために、現在では栽培が中止されている。

食生活が多様化し、食の広がりを求める現在の風潮から見ても、これまでにあまり食されていない赤混黒米の性質について明らかにすることは、意義深いものと思われる。今回は特に、赤混黒米に含まれる赤色色素に着目し、近年、注目されている食品の機能性の中から、抗酸化性について検討を行った。

実験方法

1. 試料

平成11年に、三重県多気郡明和町で収穫され、供与さ

* 三重大学
(Mie University)

** 南九州大学
(Minamikyushu University)

[§] 連絡先 三重大学 教育学部 〒514-8507 津市栗真町屋町1577
TEL/FAX 059(231)9297

れた赤混黒米、赤米、黒米を試料として用いた。赤混黒米の学名、品種などについては不明であるが、赤混黒米の写真を図1に示したとおり、外皮に黒色の部分と茶褐色の部分が混在しており、赤米および黒米とは明らかに外観が異なっていたことから、別品種のものであると推察される。

2. 試薬

5,5'-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) は同仁化学研究所(株)製を、その他の試薬はナカライテスク(株)、和光純薬工業(株)製の特級品を用いた。

3. 色素の調製

有色米 20 g に対し 100 ml のジエチルエーテルを加えて一晩放置し、脱脂を行った。ジエチルエーテルをろ過して除き、乾燥させた米に 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 95% エタノール 100 ml を加え、一晩放置して色素を抽出し、これを減圧乾固した後、真空乾燥を行い粗色素とした。なお、100 g の米から1回の抽出で得られる粗色素量は、赤混黒米から約 0.6 g、赤米から約 0.4 g、黒米から約 0.6 g であった。

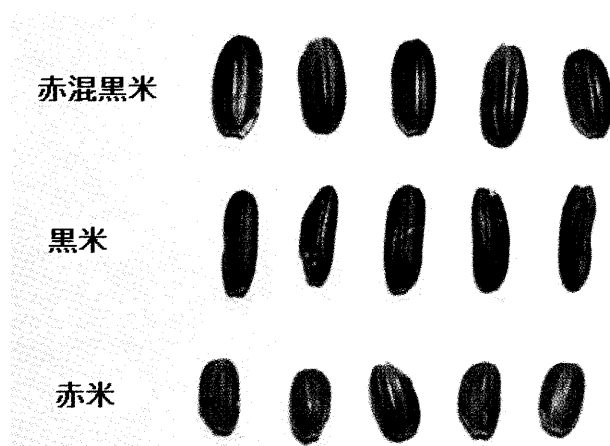


図1. 赤混黒米、黒米および赤米の写真

4. 色素の分画

色素の分画は小宮らの方法^{8,9)}に従った。すなわち、減圧乾固した粗色素に水と酢酸エチルを加え、水層と酢酸エチル層に分画した。次に水層にはブタノールを加え、ブタノール層を分取した。これを減圧乾固し、真空乾燥した。酢酸エチル層は同様に減圧乾固し、真空乾燥した。なお、100 gの赤混黒米からの色素の収量は、ブタノール画分が0.08 g、酢酸エチル画分が0.2 gであった。

5. 抗酸化性試験

(1) 脂質の酸化抑制能

脂肪酸としてリノール酸を用い、色素共存下で過酸化反応を行ない、生じたりノール酸の過酸化物をロダン鉄法で分析した¹⁰⁾。まず、酸化反応溶液の調製として、1.3% リノール酸含有エタノール1 ml、粗色素及び分画色素をエタノールに溶解して調製した色素溶液0.1 ml、0.1 M リン酸緩衝液 (p.7.0) 0.5 ml、イオン交換水1 ml及びラジカル開始剤として0.5 M 2,2'-azobis-2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH) 0.01 mlを10 ml容褐色ねじ口試験管に取り、よく攪拌後密栓し、40℃の恒温器内で20時間放置したものを試料として用いた。この際コントロールとして抗酸化物質無添加のものと、既知抗酸化剤として0.008% 2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT) 溶液を添加したものを測定ごとに同様に調製した。次に、この試料50 μ lに75% エタノール4.85 ml、30% チオシアン酸アンモニウム0.05 ml、20 mM 塩化第一鉄3.5% 塩酸溶液0.05 mlを加え、よく攪拌して3分間放置後、500 nmにおける吸光値を測定し、次式により脂質過酸化抑制能を算出した。脂質過酸化抑制能 (%) = $\{1 - (\text{試料添加時の吸光値} / \text{コントロールの吸光値})\} \times 100$

なお、データは3回の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

(2) DPPH ラジカル捕捉能

抗酸化性の指標の一つとして、フリーラジカルのモデルである1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルを用い、これに対する捕捉能を比色法により測定した。すなわち、250 μ M DPPH 溶液1 mlにMcIlvaine 緩衝液 (pH 6) (0.1 M クエン酸・0.2 M Na₂HPO₄) 1 mlを加えて混合し、これに試料0.1 mlを加えて混合し、10分間放置後517 nmにおける吸光度を測定した。なお、データは試料無添加の場合のラジカル捕捉能を0とした%について、4回測定の平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。

(3) OH ラジカル捕捉能

抗酸化性の指標として活性酸素の一種であるOH ラジカルの捕捉能について検討を行った。6.5 μ M アスコルビン酸水溶液50 μ l、1.4 M 過酸化水素溶液35 μ l、0.1 mM 塩化第二鉄水溶液50 μ lに色素溶液を50 μ l添加し、攪拌後、スピントラップ剤としてDMPO 15 μ lを添加し、5秒攪拌し、DMPO 添加60秒後、残存するOH ラジカルのピークをESR spectrometer (日本電子社製, ESR SPECTROM-

ETER (JES-REIX)) により測定した¹¹⁾。なお、データは3回測定の平均値 $\pm$ 標準偏差について、試料無添加の場合のラジカル捕捉能を0とした%で示した。

6. 分画色素の分析

分画色素について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析を行った。カラムはInertsil ODS-3 カラム (4.6 mm $\times$ 250 mm, GL Science 製) を用い、カラム温度30℃で、溶離液A液 (1.5% リン酸水溶液) 75%, B液 (1.5% リン酸溶液, 20% 酢酸, 25% アセトニトリル水溶液) 25% で開始し、B液を60分間で55% まで直線的に増加させてグラジエント溶出し、フォトダイオードアレイ UV-VIS 検出器 MD-1510 (Jasco) で検出した。また、ブタノール画分については核磁気共鳴スペクトルにより同定を行った。

実験結果及び考察

1. 過酸化脂質生成抑制能

脂質の酸化抑制については、脂肪酸であるリノール酸を基質とし、ラジカル開始剤 AAPH により誘発した自動酸化に対する色素の抑制効果について、検討を行った。表1に示すとおり、いずれの有色米色素とも色素濃度0.01%では、抑制能はわずかであった。色素濃度0.1%では赤混黒米色素の酸化抑制率は66%であり、赤米色素の64%と同程度、黒米色素20%よりかなり高い抑制能を示した。また、赤混黒米、赤米がそれぞれ黒米より有意に高かった。さらに濃度をあげて検討したところ、色素濃度1%では赤混黒米色素93%、赤米色素95%、黒米色素94%と3種とも90%以上の高い抑制能を示した。なお、この値は既知の抗酸化剤であるBHT 0.2%の抑制能と同程度であった。

2. DPPH ラジカル捕捉能

次に、DPPH ラジカルに対する捕捉能を比色法で測定した。表2に示すとおり、いずれの色素も濃度の増加に伴い、捕捉能が高くなるという傾向が見られた。色素濃度0.1%において最も捕捉能が高かったのは赤混黒米で、捕捉能は赤混黒米52%、次いで赤米33%、黒米20%であり、いずれも有意差が見られた。

3. OH ラジカル捕捉能

OH ラジカルは脂質過酸化の第一段階である水素の引き

表1. 有色米色素のリノール酸の酸化抑制

試料	脂質過酸化抑制能 (%)		
	粗色素濃度 (%)		
	0.01	0.1	1
赤混黒米	2.39 $\pm$ 9.33	65.6 $\pm$ 9.43 ^a	92.7 $\pm$ 5.01
赤米	2.26 $\pm$ 6.52	63.7 $\pm$ 9.24 ^b	94.6 $\pm$ 0.46
黒米	1.56 $\pm$ 19.0	20.3 $\pm$ 7.29 ^a	93.8 $\pm$ 0.76

^a 赤米に対して有意差あり (p<0.01)

^b 黒米に対して有意差あり (p<0.01)

赤混黒米の色素の抗酸化性

表 2. 有色米色素の DPPH ラジカル捕捉能

試料	DPPH ラジカル捕捉能 (%)		
	粗色素濃度 (%)		
	0.01	0.1	1
赤混黒米	3.27±2.74	52.3±1.26 ^{ab}	96.5±0.38 ^{ab}
赤米	3.08±1.01	32.8±1.62 ^b	98.7±0.51
黒米	1.52±1.20	19.7±0.39 ^a	99.9±0.09

^a 赤米に対して有意差あり (p<0.01)^b 黒米に対して有意差あり (p<0.01)

表 3. 有色米色素の OH ラジカル捕捉能

試料	OH ラジカル捕捉能 (%)		
	粗色素濃度 (%)		
	0.01	0.1	1
赤混黒米	51.5±6.67 ^{ab}	88.9±5.90	86.1±7.34
赤米	18.7±6.04 ^b	79.7±10.7	91.5±10.4
黒米	n.s.	87.1±13.7	91.8±7.62

^a 赤米に対して有意差あり (p<0.01)^b 黒米に対して有意差あり (p<0.01)

n.s. 捕捉せず

抜きや、脂質過酸化物であるヒドロペルオキシドの生成に関与することが知られている。そこで、抗酸化性の指標として、活性酸素の一つである OH ラジカルに対する捕捉能について検討を行った。

OH ラジカル捕捉能について、分析した結果を表 3 に示した。赤混黒米は色素濃度 0.01% の低濃度でもラジカル捕捉能を示し、52% であった。これと比較して、赤米色素は 19%、黒米色素は捕捉能が見られず、いずれも赤混黒米よりも有意に低かった。色素濃度 0.1% では赤混黒米の捕捉能は 89% と黒米 87% とほとんど差はなかったが、赤米 80% よりは若干、高かった。

4. 分画色素の抗酸化性

次に、赤混黒米色素中のどのような成分が抗酸化性に寄与しているのかについて検討するために、実験方法において述べた方法により溶媒分配を行い、ブタノール層に分画された色素を色素 A、酢酸エチル層に分画された色素を色素 B として、粗色素と同様に抗酸化性試験を行った。表 4 に示すとおり、リノール酸の酸化抑制においては、色素濃度 0.5% で色素 B は 77% と色素 A の 62% よりも有意に高い抑制能を示した。

DPPH ラジカル捕捉能については、色素 B より、色素 A の捕捉能が有意に高く、0.1% 濃度では色素 A は 99% と色素 B の 58% よりも有意に高い抑制能を示した。

OH ラジカル捕捉能については、0.1% 濃度の捕捉能は色素 A が 55%、色素 B が 69% であり、色素 B が高い傾向を示したが、有意差は見られなかった。

以上の結果より、脂質過酸化抑制能および OH ラジカル

表 4. 赤混黒米に含まれる色素の抗酸化能

	粗色素濃度 (%)	抑制能および捕捉能 (%)	
		色素 A*	色素 B**
脂質過酸化抑制能	0.5	61.7±3.91	76.8±3.19 ^a
DPPH ラジカル捕捉能	0.1	99.2±0.55	58.1±1.50 ^a
OH ラジカル捕捉能	0.1	54.7±6.37	68.9±6.17

* 色素 A: 赤混黒米から抽出した粗色素に含まれるブタノール層に分画される色素

** 色素 B: 赤混黒米から抽出した粗色素に含まれる酢酸エチル層に分画される色素

^a 色素 A に対して有意差あり (p<0.01)

捕捉能に関しては、色素 A、B 両方の色素が寄与しているが、色素 B の寄与が高く、DPPH ラジカル消去能に関しては、主として色素 A が寄与していることが明らかとなった。

5. 分画色素の分析・同定

赤混黒米色素のブタノール画分および酢酸エチル画分について HPLC 分析を行った結果を図 2 に示す。ブタノール画分 (図 2-a, b) は 310 nm および 520 nm に吸収を持つピークが見られ、標準物質の保持時間との比較より、シアニジン 3-グルコシド (Cy 3-Glc) と考えられた¹²⁾。これを確認するため、¹H-NMR 分析を行った結果、標準物質の特徴的なピークと一致したことから、Cy 3-Glc と同定された。

また、図 2-c に示す通り、酢酸エチル画分には 520 nm 付近での吸収をもつ物質は検出されず、アントシアニン系以外の色素であることが示唆された。また、同画分に塩化第二鉄溶液を添加すると、赤色から汚緑色に変化した。これは、タンニンの特徴的な性質であることから¹³⁾、タンニンの存在が示唆された。また、図 2-d に示すように、紫外部に吸収を持つピークがいくつか見られたが、詳細については不明である。

赤混黒米の色素の一つであるアントシアニンの抗酸化性については、既研究で明らかになっており、大澤らは黒米が赤米および白米に比べ高い抗酸化性を示し、抗酸化性色素は Cy 3-Glc であり、特に酸性領域で強い抗酸化性を示したこと、ワイルドライス抽出物がフリーラジカルに対する捕捉能があることを報告している¹⁴⁾。また、Cy 3-Glc については、体内での作用についての解析が行われ¹⁵⁾、個体レベルでの抗酸化性も確認されている¹⁶⁾ ことから、同じ Cy 3-Glc を含む赤混黒米についてもその効果が期待できると思われる。また、タンニン系色素については、赤米品種である「ベニロマン」と「総社赤米」がタンニン系色素を豊富に含み、アントシアニン系色素を含有する黒米品種「朝紫」や「中国黒米」よりも高い抗酸化性を示すことが報告されている¹⁷⁾。本実験により、赤混黒米には、上記の二種類の抗酸化性成分が含まれることが示唆されたことから、相乗的な効果も期待される。今後は、赤混黒米の調理

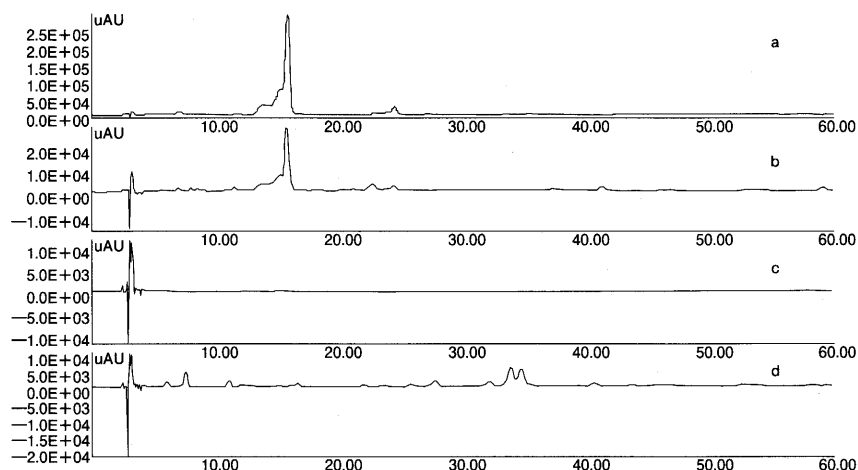


図 2. 分画色素の HPLC パターン

- a: ブタノール画分 (色素 A), 検出波長: 520 nm
 b: ブタノール画分 (色素 A), 検出波長: 310 nm
 c: 酢酸エチル画分 (色素 B), 検出波長: 520 nm
 d: 酢酸エチル画分 (色素 B), 検出波長: 310 nm

および加工食品の応用について検討するとともに, 調理による抗酸化活性の変化についても検討を行っていく予定である。

要 約

赤混黒米から抽出した色素の抗酸化性を, リノール酸の過酸化抑制能, DPPH ラジカル捕捉能および OH ラジカル捕捉能の評価系を用いて測定した。

1. 赤混黒米から抽出した色素は, 赤米および黒米から抽出した色素よりも高い抗酸化性を有することが明らかとなった。
2. 赤混黒米色素を分画したところ, ブタノール層と酢酸エチル層に分画される 2 種類以上の色素が得られた。
3. ブタノール層に分画される色素は HPLC 分析および $^1\text{H-NMR}$ 分析を行った結果, Cy-3-Glc と同定された。また, 酢酸エチル層にはタンニンの存在が示唆された。

文 献

- 1) 小川正巳, (1992), 赤米, 化学と生物, **30**, 385-388
- 2) 高橋康次郎, 杉本多起哉, 二浦孝志, 鷲巣幸太, 吉沢淑, (1989), 赤米色素の分離同定, 醸協, **84**, 807-812
- 3) 小川宣子, 中村優希, 田名部尚子, (1993), 赤米の調理特性に関する研究 (第 1 報) 赤米の理化学的特性について, 家政誌, **44**, 839-844
- 4) 小川宣子, (1995), 赤米の調理特性に関する研究 (第 2 報) 赤米の炊飯条件の検討, 家政誌, **46**, 531-537。
- 5) 高橋康次郎, 吉沢淑, (1987), 赤米色素とそれを利用した酒類の製造, 醸協, **82**, 740-744
- 6) 前川季義, 新家龍, (1989), 赤米色素の性質と赤米と原料とした清酒製造試験, 醸協, **84**, 787-793
- 7) 門倉利守, 丸山智香, 中里厚実, 竹田正久, 金子太吉,

名越時秀, 大森俊一, (1995), 黒米および赤米を原料とした赤ライスワインの試醸, 東農大農学集報, **40**, 1-7

- 8) Katsuzaki, H, Hibasi, H., Ohwaki, S., Ishikawa, K., Imai, K., Kimura, Y. and Komiya, T., (2003), Cyanidin-3-o- β -D-glucoside isolated from skin black glycine max and other anthocyanin isolated from skin of red grape induced apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells, *Oncology Report*, **10**, 297-300
- 9) 小宮孝志, 大脇進治, 勝崎裕隆, 今井邦雄, 伊達久美子, 木村幸信, 樋廻博重, (2001), クロマメ種皮に含まれる抗腫瘍活性物質の探索とその作用機作, 食品科学工学会第 48 回大会要旨集, p. 143
- 10) 白坂憲章, 暮松亜紀, 金銅信之, 金銅俊二, 飯田雅弘, 長谷川豪宏, 村上哲男, 吉栖肇, (1999), 梅酒の抗酸化性と抗酸化物質との単離と同定, 食科工誌, **46**, 792-798
- 11) 西川弘恭, 吉川敏一編, (1989), 「ESR とフリーラジカル」, 日本医学館, 東京, 155-159
- 12) Terahara, N, Saigusa, N., Ohba, R., Ueda, S., (1994), Composition of anthocyanin pigments in aromatic red rice and its wine., *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **41**, 519-522
- 13) 稲垣勲, (1968), 「植物化学」, 医歯薬出版, 東京, 183
- 14) 大澤俊彦, (1995), 植物の持つ抗酸化防御機構と抗酸化成分の検索, *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, **163**, 19-29
- 15) Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T., (1989), Dietary cyanidin 3-o-beta-D-glucoside increases in vivo oxidation resistance of serum in rats., *Lipids*, **33**, 583-588
- 16) Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T., (1996), Oxidation products of cyanidin 3-o- β -D-glucoside was free radical initiator., *Lipids*, **31**, 1259-1263
- 17) 猪谷富雄, 建本秀樹, 岡本実剛, 藤井一範, 武藤徳男, (2002), 有色米の抗酸化活性とポリフェノール成分の品種間差異, 食科工誌, **49**, 540-543

(平成 18 年 1 月 12 日受付, 平成 18 年 5 月 24 日受理)