

リノール酸の自動酸化に対する山菜抽出物の抗酸化作用(1)

Antioxidative Action of Extracts of Edible Wild Plants during the Autoxidation of Linoleic Acid (1)

土 屋 律 子
Ritsuko TSUCHIYA

I. はじめに

近年、多くの天然物に含まれる抗酸化性成分に関する研究報告が多い¹⁻⁴⁾。従来の合成抗酸化剤に代わる安全性の高い天然抗酸化物質として、また最近では過酸化脂質や活性酸素に起因する老化や発ガン、糖尿病、血管障害等、様々な疾病等との関係が明らかになっている^{5,6)}。フラボノイドなどのポリフェノール、アスコルビン酸、トコフェロール、カロチノイドなどの抗酸化性成分の関与が知られている⁷⁾。

これまで安全で抗酸化活性の高い植物素材の検索を目的に、生薬、山菜などについて検討し、若干の知見を報告⁸⁻¹⁰⁾してきた。本研究では従来の知見をふまえ、9種類の山菜の抗酸化活性について検討した。いくつかのものに強い活性があると認められ、加えて抗酸化活性に関与すると思われる成分の若干の検討も行ったのでここに報告する。

II. 実験方法

1. 実験試料

試料は、あざみ (*Cirsium japonicum* DC), いらくさ (*Urtica thunbergiana* Sieb.et Zucc), しゃく (*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.subso.aemula (Woron.) Kitam), せり (*Oenanthe japonica* (Blume) DC.), よもぎ (*Artemisia princeps* Pamp.), ごとみ (*M.struthiopteris* Todaro), もみじがさ (*Cacalia delphiniifolia* Sieb. et Zucc), ふきのとう (*Liquidambar formosana* Hance), 西洋わさび (*Cochlearia armoracia* L.) の9種類の山菜を用いた。あざみ, いらくさ, しゃくは上川町で, せり, ごとみは春香山麓付近で, よもぎはこの両地域で, ふきのとうは春香山麓や道路わき上に出たものを, いずれも4月上旬から5月上旬にかけて採集した。もみじがさは5月中旬に厚真町で採集した。使用部位はもみじがさは茎, ふきのとうは鱗片包を取り除き花穂, 西洋わさびは根, その他の試料は葉および茎を使用した。

2. 試薬

リノール酸(純度99%以上)はSIGMA社製を, その他, 2(3)-*t*-ブチル-4-ヒドロキシアニソール(BHA), チオシアン酸アンモニウム(特級), トリクロロ酢酸(特級), エタノール(99.5%), β -カロテン, Folin-Ciocalteu 試薬および Tween80は和光純薬(株)の製品を用いた。高速

液体クロマトグラフィー(HPLC)用エタノール, アセトニトリルも和光純薬(株)の製品を用いた。

3. 抽出方法および試料溶液の調製

抽出方法は Fig.1に示した。即ち, 採集した各試料を細かく刻み, 同量のエタノールを用い室温で3回, 抽出を繰り返した。ロータリーエバポレーターで減圧濃縮(40°C)を行い, 抽出物を得た。この一部を酢酸エチル・水(1:1, v/v)で抽出し, 酢酸エチル層を得, 無水硫酸ナトリウムを加え一晩放置後, 再びロータリーエバポレーターで減圧濃縮(30°C)し, 乾固物を得た。この抽出物からエタノール(99.5%)で試料溶液を調製し, 下記の実験を行った。

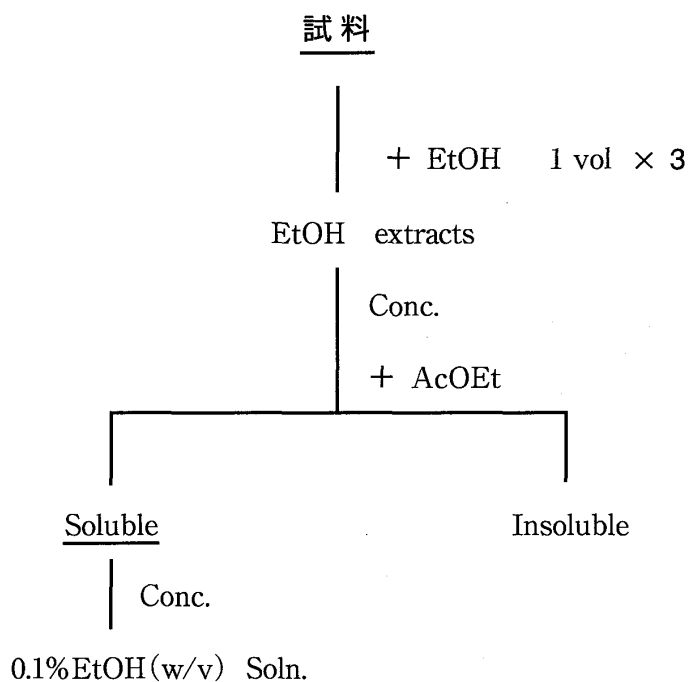


Fig.1 実験方法

4. 測定および定量方法

(1) 抗酸化活性試験¹¹⁾

リノール酸が酸化生成され生ずる過酸化物を測定するロダン鉄法 (Ferric thiocyanate method), およびリノール酸の過酸化物の酸化がさらに進んで生成されるマロンアルデヒドの量を測定する TBA 法 (Thiobarbituric acid method), この2つの方法で行った。

① ロダン鉄法 (Ferric thiocyanate method)

各試料の0.1%エタノール(99.5%)溶液2.0ml, 2.51%リノール酸のエタノール(99.5%)溶液2.0ml, 0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)4.0ml, 水2.0ml, 界面活性剤(Tween80)2-3滴をサンプル瓶に入れて反応液とした。ただし, リノール酸が十分溶解していない可能性も考えられるため, 2.51%リノール酸のエタノール溶液調製時に界面活性剤(Tween80)を0.01%になるように加えミキサーで十分攪拌し, あらかじめ18°Cに設定した water bath shaker で約15,6時間攪拌させた後, 実験に用いた。試料を含まない99.5%エタノール溶液を加えたものを対照(Control)とし, 比較物質として合成抗酸化剤である BHA を用いた。これらの反応は, 60°Cに設定した上記の water bath shaker, 90回 min⁻¹で, 遮光に近い状態で行った。この反応液0.1mlを採取し, ロダン鉄法により, エタノール(75%)9.7ml, 30%チオシアン酸アンモニウム0.1mlの割合で試験管に入れよく攪拌後, 0.02M塩酸第二鉄3.6%溶液0.1mlを加え正確に3分後, 分光光度計(島津紫外可視分光光度計 UVmini-1240)を用い, 500nmの吸光度を測定した。測定は毎日行い, Controlの吸光度が2.0を越えるまで行った。

② TBA 法 (Thiobarbituric acid method)

前述のロダン鉄法による Controlの吸光度が2.0を越えた後, TBA法による測定を行った。

反応液 2ml に対し、0.7%チオバルビツール酸水溶液 1ml, 20%トリクロロ酢酸水溶液 2ml を試験管に入れ、沸騰水溶液中に10分間つける。冷却後、遠心分離(3000rpm, 10min) し、532nm の吸光度を測定した。

(2) 総フェノール量の定量

Folin-Ciocalteu 法¹²⁾変法により定量したポリフェノール量を総フェノール量とした。試料溶液は各0.1%エタノール溶液、またはさらにエタノールで希釈し使用した。この試料溶液1ml に10倍希釈した Folin-Ciocalteu 試薬5ml を加え、添加後30秒以上8分以内に7.5%炭酸ナトリウム溶液4ml を加えよく攪拌した。この溶液を50°C, 5分間温浴中で保温後、放置して室温に戻してから上記、分光光度計で765nm の吸光度を測定した。試料の総フェノール量は没食子酸標準液による検量線から没食子酸相当量として算出した。

(3) β -カロテンの定量

各試料の酢酸エチル抽出物をエタノールで希釈し、0.45 μ m のフィルターでろ過後、試料溶液とし、島津製の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて β -カロテン量を定量した。分析条件は次のとおりである。カラム：STR ODS-II (250mm \times 4.6mm,i.d.), 検出器：UV-VIS 検出器 SPD-10Ayp(波長450 nm), 移動相：アセトニトリル/エタノール=1:1(v/v), 流速：1.0 ml/min.とした。また、データ処理には島津クロマトパック C-R8A を用いた。

III. 実験結果および考察

1. 抗酸化活性試験

9種類の山菜エタノール抽出物のリノール酸に対する抗酸化活性測定は2回に分けて行った。1回目は、あざみ、いらくさ、しゃく、せり、よもぎを、2回目はここみ、すどけ、ふきのとう、西洋わさびの計9種類について、60°Cでの反応条件下におけるロダン鉄法による測定結果を Fig.2-1, 2-2に示した。これを見ると Control そして西洋わさびは急激に酸化されているが、その他の各試料は合成酸化剤である BHA よりも強い抗酸化活性がみられる。

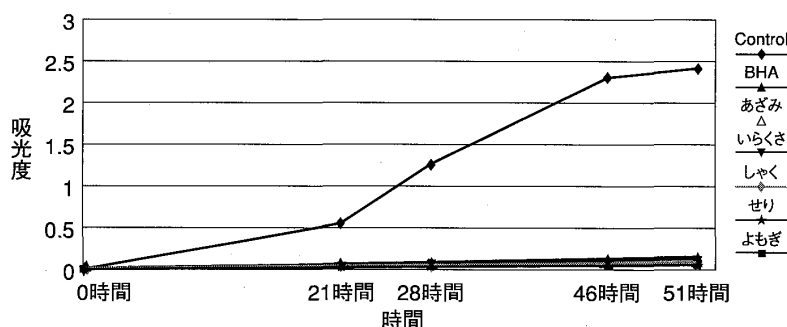


Fig.2-1 各試料のリノール酸に対する抗酸化活性(ロダン鉄法)

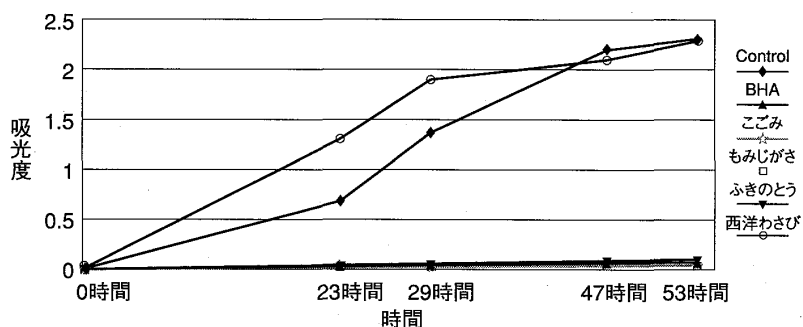


Fig.2-2 各試料のリノール酸に対する抗酸化活性(ロダン鉄法)

Fig.3-1, 3-2は、これらの54時間後の反応液の抗酸化活性を、TBA法によって測定したものである。ここでも、西洋わさびを除く各試料でBHAよりも強い抗酸化活性がみられた。なお、TBA法による測定結果とロダン鉄法の結果が必ずしも一致しないのは、TBA法が、必ずしも不飽和脂肪酸の酸化分解物であるマロンアルデヒド (MDA)のみに特異的に反応するものではないと考えられる⁷⁾。よもぎ、もみじがさ、ふきのとうについては

すでにリノール酸に対して高い抗酸化活性をもつという結果⁸⁻¹⁰⁾を得ている。また、リノール酸を基質とし107種の山菜、野菜、香辛菜をエーテル、エタノール、水の溶媒で抽出し、過酸化価(POV)とTBA価から抗酸化力を測定した報告¹³⁾によると、26種に強い結果が得られ、特にもみじがさ、あざみの水抽出液、ふきのとうについてはエーテル抽出液に強い活性を認めている。この抗酸化活性をトコフェロール量との関連から検討しているが相関関係は得られず、トコフェロール以外の多様な成分の存在のためとしている¹³⁾。

Fig.4の抗酸化比活性は、前述のロダン鉄法による抗酸化活性をControlの吸光度を1として酢酸エチル抽出物1gあたりに換算した結果である。もみじがさ>こごみ>あざみ>よもぎ>しゃく>せり>ふきのとう>いらくさの順に活性が高い。さらにFig.5は各山菜100gあたりに換算して同様に抗酸化全活性とし、比較した結果である。もみじがさ>あざみ>よもぎ>こごみ>せり>しゃく>いらくさ>ふきのとうの順に活性が高い。もみじがさ、あざみ、よもぎ、こごみは全活性、比活性共に高い活性を示していることがわかる。

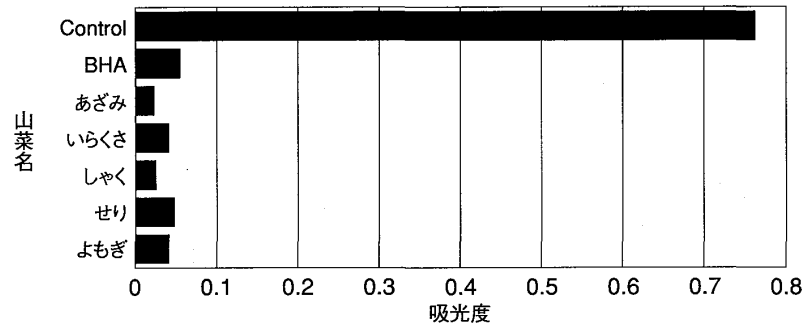


Fig.3-1 各試料のリノール酸に対する抗酸化活性(TBA法)

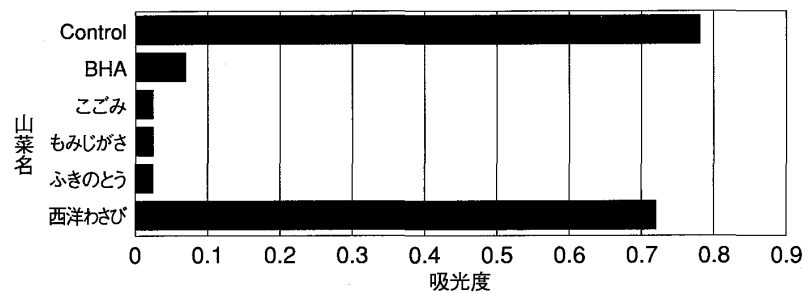


Fig.3-2 各試料のリノール酸に対する抗酸化活性(TBA法)

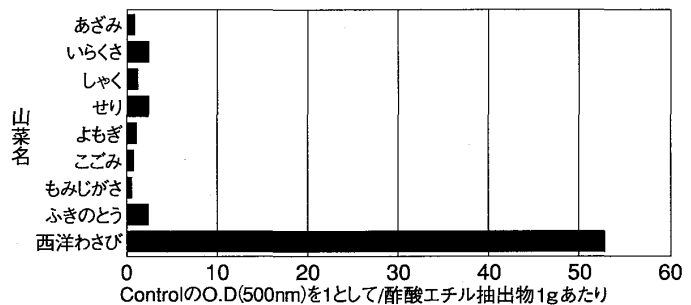


Fig.4 抗酸化比活性(ロダン鉄法)

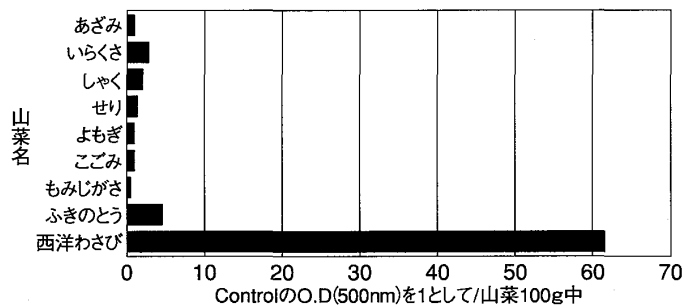


Fig.5 抗酸化全活性(ロダン鉄法)

2. 総フェノール量の定量

Folin-Ciocalteu法により各試料の総フェノール量は没食子酸標準液から検量線($y=0.0100x$)を作成し、没食子酸相当量として算出した。Fig.6に各山菜100g中に含まれる総フェノール量を示した。ふきのとう>よもぎ>しゃく>こごみ>あざみ>もみじがさ>せり>いらくさ>西洋わさびの順にフェノール性物質が多く含まれている。

Fig.7に抗酸化全活性と総フェノール含量との関係を見たが、これらに相関関係は見られなかった。

野菜、穀類、果実など92種類のフェノール量をFolin-Ciocalteu法で測定した報告¹⁴⁾によると、野菜類に含まれる量は非常に低く、共存する物質や酸化生成物の影響^{14,15)}を受け、フェノール含量と抗酸化活性との相関は必ずしもみられないとしている¹⁴⁾。しかし、一方でアスパラガス、ショウガ等、43種の野菜の80%メタノール抽出液の抗酸化性とポリフェノール含量との相関性が($r=0.4694$)明らかとの報告¹⁶⁾もある。

3. β -カロテンの定量

各試料の β -カロテン量は、調製標準液の保持時間約15.5分の活性ピークの面積から算出した。各山菜100g中に含まれる β -カロテン量をFig.8に示した。しゃく>よもぎ>せり>あざみ>いらくさ>こごみ>もみじがさ>ふきのとう>西洋わさびの順であった。 β -カロテンが抗酸化活性をもつことは広く知られている¹⁷⁻¹⁸⁾。しかし、Fig.9に抗酸化全活性と β -カロテン量との関係を検討したが、ここではこれらに相関関係は見られなかった。

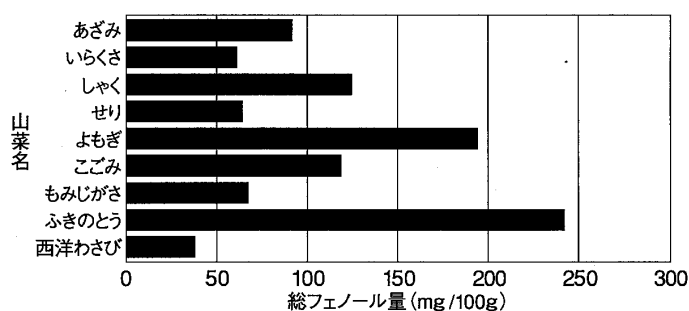


Fig.6 山菜中の総フェノール量

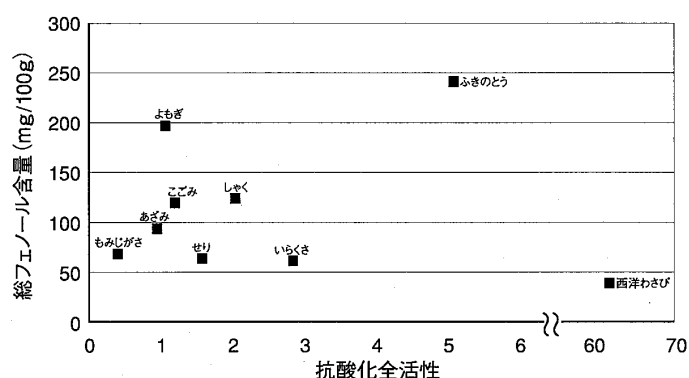


Fig.7 抗酸化全活性と総フェノール量

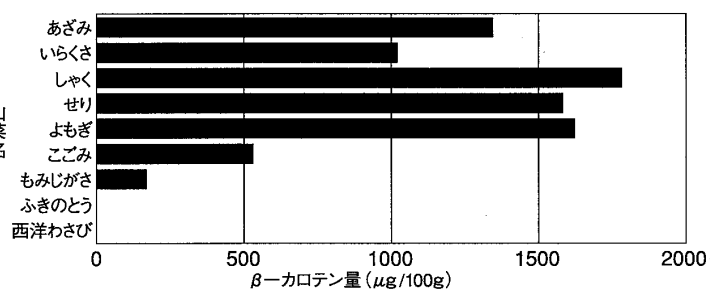


Fig.8 山菜中の β -カロテン量

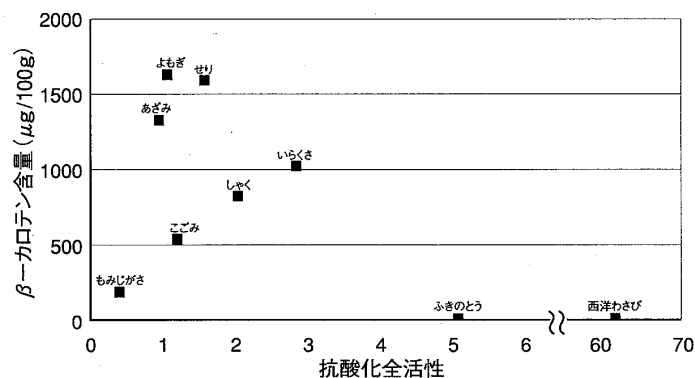


Fig.9 抗酸化全活性と β -カロテン量

IV. まとめ

- (1) あざみ、いらくさ、しゃく、せり、よもぎ、こごみ、すどけ、ふきのとう、西洋わさびの計9種類について、抗酸化活性についての検討を行った。その結果、ロダン鉄法、TBA法の両法で西洋わさびを除く試料にBHAより強い活性を認めた。
- (2) 抗酸化比活性(試料の酢酸エチル抽出物1gあたりに換算)は、もみじがさ>こごみ>あざみ>よもぎ>しゃく>せり>ふきのとう>いらくさの順であった。抗酸化全活性(山菜100gあたりに換算)は、もみじがさ>あざみ>よもぎ>こごみ>せり>しゃく>いらくさ>ふきのとうの順であった。
- (3) 今回の抽出方法による山菜100g中の総フェノール含量は、ふきのとう>よもぎ>しゃく>こごみ>あざみ>もみじがさ>せり>いらくさ>西洋わさびの順であった。しかし、抗酸化全活性と総フェノール含量とに相関関係は見られなかった。
- (4) 今回の抽出方法による山菜100g中の β -カロテン含量は、しゃく>よもぎ>せり>あざみ>いらくさ>こごみ>もみじがさ>ふきのとう>西洋わさびの順であった。しかし、 β -カロテン含量と抗酸化全活性に相関関係は見られなかった。
- (5) 今回の実験で、抗酸化活性の高い山菜について引き続き検討を続ける。アスコルビン酸、クロロフィル、トコフェロールと抗酸化活性の相互関係や山菜の収穫時期が限られているため保存方法による影響についてもあわせて検討する必要がある。

附 記

本研究は北海道浅井学園大学短期大学部における平成12年度教員特別研究費の助成によるものである。また、平成12年度日本調理科学会東北・北海道支部で研究発表後、加筆したものである。

参考文献

- 1) 福田靖子, 大澤俊彦, 川岸舜朗, 並木満夫: 黒ゴマ種子の抗酸化について, 日本食品工業学会誌, **38**, 915-919 (1991)
- 2) 津田孝範・藤井正人・渡邊美栄・中莖秀夫・大島克己・大澤俊彦・川岸舜朗: インゲンマメ抽出物の抗酸化性と食品加工への応用, 日本食品工業学会誌, **41**, 475-480 (1994)
- 3) 南条文雄: 茶カテキン類のラジカル消去作用, *New Food Industry*, **40**, 61-67(1998)
- 4) Winthrop B. Phippen and James E. Simon: Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum* L.), *J. Agric. Food. Chem.*, **46**, 1734-1738(1998)
- 5) 日本栄養・食糧学会監修: 活性酸素と栄養, 光生館, 1995
- 6) 大柳善彦: 活性酸素と病気, 化学同人, 1994
- 7) 中村良, 川岸舜, 渡邊乾二, 大澤俊彦: 食品機能化学, 三共出版, 1995

- 8) 土屋律子：リノール酸の自動酸化に対する生薬エタノール抽出物の抗酸化作用(1), 北海道女子大学短期大学部紀要, 第35号, 27-32(1998)
- 9) 土屋律子：リノール酸の自動酸化に対する生薬エタノール抽出物の抗酸化作用(2), 北海道女子大学短期大学部紀要, 第36号, 49-58(1999)
- 10) 土屋律子：リノール酸の自動酸化に対する山菜エタノール抽出物の抗酸化作用(1), 北海道女子大学短期大学部紀要, 第38号, 55-66(2000)
- 11) 満田久輝, 安本教傳, 岩見公和：リノール酸の自動酸化に対するインドール化合物の抗酸化作用, 栄養と食糧, 19, 210-214 (1967)
- 12) E.Stahl, and P. J. Schorn: *Z.physiol.Chem.*, 325, 263(1963)
- 13) 春日敦子・青柳康夫・菅原龍幸：食用植物の抗酸化性について, 日本食品工業学会誌, 12, 828-834 (1988)
- 14) Marja P. Kahkonen, Anu I. Hopia, Heikki J. Vuorela, Jussi-Pekka Rauha, Kalevi Pihlaja, Tytti S. Kujala, and Marina Heinonen: Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, *J. Agric.Food Chem.*, 47, 3954-3962(1998)
- 15) Andrea Roeding-Penman and Michael H. Gordon: Antioxidant Properties of Catechins and Green Tea Extract in Model Food Emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4267-4270(1997)
- 16) 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木柁吉：各種野菜類の抗酸化性の評価及び数種の抗酸化成分の同定, 日本食品工業学会誌, 41, 611-618 (1994)
- 17) 大澤俊彦：がんを防ぐ52の野菜, 法研, 1994
- 18) ウィーター：ベータ・カロチン, 東京化学同人, 1993