

## 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)

Antioxidative Action of Ethanol Extracts of Crude Drugs  
during the Autoxidation of Linoleic Acid (2)

土 屋 律 子  
Ritsuko TSUCHIYA

### I は じ め に

食品の品質の劣化のひとつに脂質の酸化があげられる。特に不飽和脂肪酸を含む食品は容易に過酸化脂質を生成し、酸敗臭の発生や毒性の発現に至る。またこの過酸化脂質の生成、蓄積は生体内においても起こり、DNA の損傷や突然変異、発ガン、老化に関わっている。これらの酸化を抑える合成抗酸化剤として従来、BHT, BHA が、また天然抗酸化剤として  $\alpha$ -トコフェロールなどが使われている。しかし、安全性や効果面から、より優れた安全性の高い抗酸化剤が求められ、食用植物のなかでは油糧植物、香辛植物などや、医食同源の視点から和漢薬の研究も進んでいる<sup>1-4)</sup>。また最近の赤ワインブームもその一つで、日常の食品の中に含まれる抗酸化性物質の効果が期待されている。

前報<sup>5)</sup>で9種類の生薬(乾燥)の抗酸化性を検討し報告したが、同じ実験方法による他の報告にくらべその実験値が低い結果となった。従って今回はそれらの再検討と、新たに10種類の生薬(乾燥)について抗酸化性を検討した。加えて抗酸化性に関与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

使用した生薬(乾燥)は前報<sup>5)</sup>と同様に、旭川市の(株)四条調剤薬局から購入した。前回の桂皮、生姜、大棗、当帰、艾葉、竹葉、紫蘇葉、人參、黄連に加え、新たに今回使用した生薬名(学名・産地・使用部位)を順にあげるがこれらはいづれも前報<sup>5)</sup>同様、(株)ウチダ和漢薬からの資料によるものである。葛根(Puerariae Radix・四川省、浙江省・根)、山茱萸(Corni Fructus・陝西省・根)、黄芩(Scutellariae Radix・河北省・根)、川芎(Cnidii Rhizoma・日本・根)、甘草(Glycyrrhizae Radix・内蒙古自治区・根、ストロン)、橘皮(Tachibana Poricarpium・浙江省・成熟した果皮)、五味子(Schisandrae Fructus・吉林省・果実)、半夏(Pinelliae Tuber・貴州省・塊茎外皮)、ヨクイニン(Coicis Semen・湖南省・成熟種子)、大黃(Rhei Rhizoma・四川省・根茎)の10種類を実験に供した。。

## 2. 試薬

リノール酸（純度 99%以上）は SIGMA 社製を，その他，2(3)-*tert*-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%），Folin-Ciocalteu 試薬および Tween 80 は和光純薬（株）の製品を用いた。

## 3. 抽出方法

試料のうち桂皮，生姜，大棗，当帰，艾葉，竹葉，紫蘇葉，人参，黄連については前回の抽出物を冷蔵保存した試料から新たに 0.1%エタノール（99.5%）溶液を調製し，実験に用いた。葛根，山茱萸，黄芩，川芎，甘草，橘皮，五味子，半夏，ヨクイニン，大黄については前回<sup>5)</sup>と同様の方法による抽出物から 0.1%エタノール（99.5%）溶液を調製し，下記の実験を行った。

## 4. 測定方法

### 1. 抗酸化活性試験<sup>6)</sup>

前回<sup>5)</sup>と同様のロダン鉄法（Ferric thiocyanate method）および TBA 法（Thiobarbituric acid method）の 2 つの方法で行った。

#### (1) ロダン鉄法（Ferric thiocyanate method）

各試料は，0.1%になるようにエタノールで調製した試料溶液を使用し，前回<sup>5)</sup>と同様の反応系で行った。しかし，前回<sup>5)</sup>の結果からリノール酸が十分溶解していない可能性も考えられたため，2.51%リノール酸のエタノール溶液の調製時に界面活性剤（Tween 80）を 0.01%になるように加えミキサーで十分攪拌し，一晚室温に静置した後，実験を行った。比較物質として合成抗酸化剤の BHA を使用した。これらの反応液を 60℃の恒温器中に静置し，一日 2 回ミキサーで十分攪拌した。この反応液 0.1 ml を採取し，75%エタノール 9.7 ml，30%チオシアン酸アンモニウム 0.1 ml を試験管に入れ良く攪拌後，塩化鉄(II)n 水和物を 3.6%塩酸溶液で調製した 0.02 M 塩化第二鉄溶液 0.1 ml を加え，正確に 3 分後 500 nm の吸光度を，分光光度計（HITACHI 100-50 形ダブルビーム分光光度計）を用い毎日，4 日目まで測定した。

#### (2) TBA 法（Thiobarbituric acid method）

測定は反応液を 60℃の恒温器中に保存 7 日後に前報<sup>5)</sup>と同じ TBA 法を用い 532 nm の吸光度を測定した。

### 2. 総フェノール量の定量

Folin-Ciocalteu 法<sup>7)</sup>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 1 ml に 10 倍希釈した Folin-Ciocalteu 試薬 5 ml 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 4 ml を加えよく攪拌した。調製した溶液を 50℃で 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 765 nm 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. フェノール性物質の確認

シリカゲル薄層クロマトグラフィー（TLC）を用い試料中のフェノール性物質<sup>8)</sup>の検討を試

みた。薄層プレートは Silicagel 70 Plate-wako (5×20 cm, 和光純薬製) を使用し, 試料溶液は各 0.1% エタノール溶液をスポットし, 展開溶媒はトルエン:クロロホルム:アセトン (40:25:35, v/v) を用いた。クロマトグラム上のスポットを長波長紫外線 (365 nm) 下で観察後, 2% 塩化第二鉄水溶液を噴霧してフェノール化合物の検出<sup>9)</sup> を行った。

### III 実験結果および考察

#### 1. 抗酸化活性試験

19 種類の生薬 (乾燥) 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 3 回に分けて行った。1 回目は, 前回<sup>5)</sup> 報告した桂枝, 生姜, 大棗, 当帰, 艾葉, 竹葉, 紫蘇葉, 人参, 黄連に, 新たに葛根, 山茱萸を加え計 11 種類について, 60°C での反応条件下, 連続 4 日目までのロダン鉄法による測定結果を Fig.1-1, 1-2 に示した。これをみると Control は 1 日目をすぎると急激に酸化されているが, 葛根, 人参を除く各試料には強い抗酸化活性がみられる。いずれも合成酸化剤である BHA には及ばないが, 当帰, 山茱萸, 大棗, 桂枝, 生姜, 艾葉, 紫蘇葉, 竹葉, 黄連の順で酸化を抑制している。Fig.2 はこれらの 7 日目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。これによると当帰の抗酸化活性が最も強く, ついで艾葉, BHA, 桂枝, 生姜, 竹葉, 大棗, 紫蘇葉の順となり, 必ずしもロダン鉄法の結果と一致しない。この理由として考えられることは前報<sup>5)</sup> で述べた他に, 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<sup>10)</sup> ことも考え

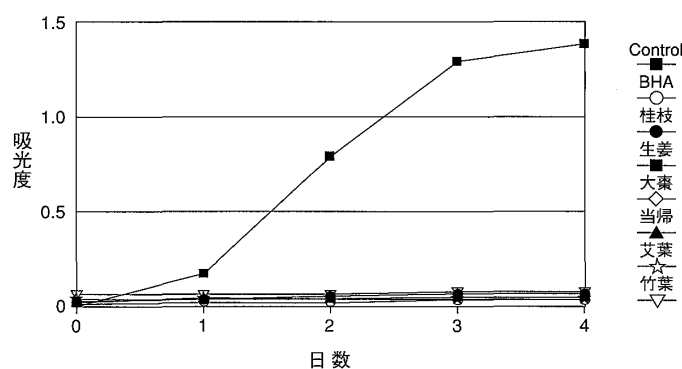


Fig.1-1. 各生薬のリノール酸に対する抗酸化活性(ロダン鉄法)

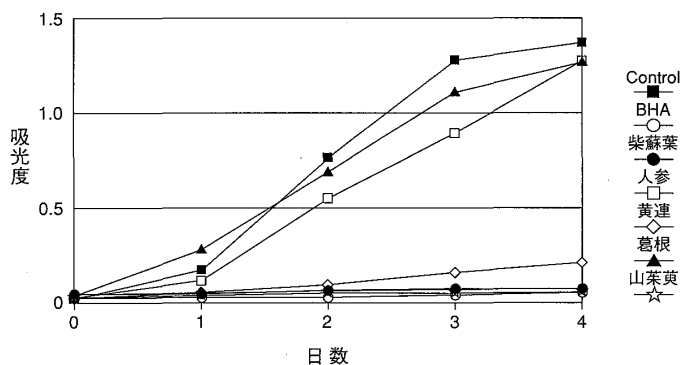


Fig.1-2. 各生薬のリノール酸に対する抗酸化活性(ロダン鉄法)

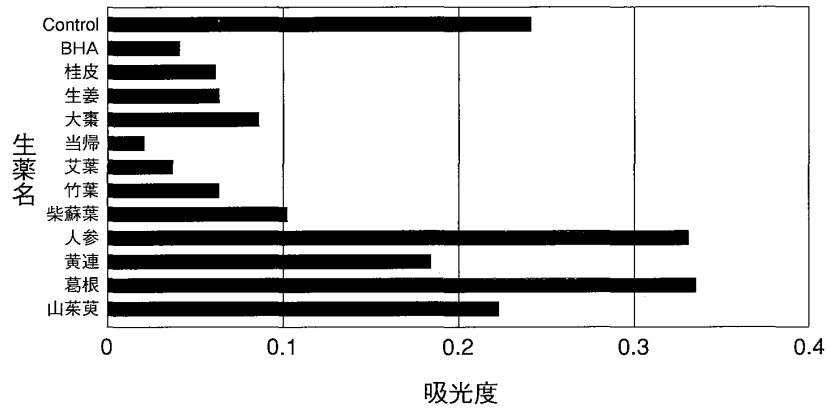


Fig. 2. 各生薬のリノール酸に対する抗酸化活性(TBA法)

られる。

2回目の黄芩、川芎、甘草、橘皮の抗酸化活性測定結果は、Fig.3, 4に示した。Fig.3に示したロダン鉄法の結果をみると、BHAについて橘皮、甘草が強い抗酸化活性を示している。黄芩は、やや高い活性を示しているが、川芎は低い。Fig.4に示したTBA法の結果もほぼ同様の結果となっている。

3回目の五味子、半夏、ヨクイニン、大黃の抗酸化活性測定結果をFig.5, 6に示した。Fig.

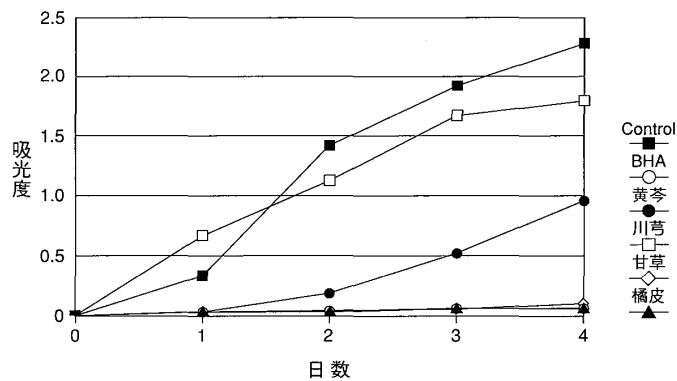


Fig. 3. 各生薬のリノール酸に対する抗酸化活性(ロダン鉄法)

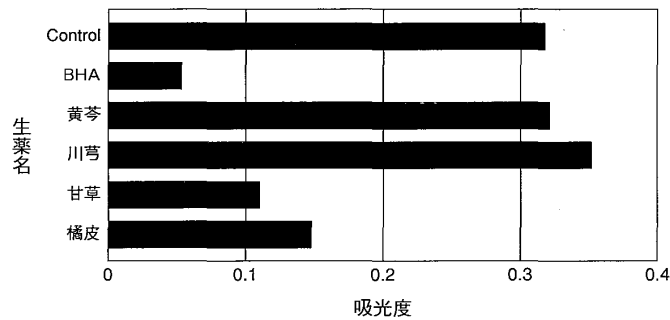


Fig. 4. 各生薬のリノール酸に対する抗酸化活性(TBA法)

5のロダン鉄法の結果をみると五味子がやや高い活性を示している。TBA法の結果をFig.6に示したが、いずれもControlより低い結果となっている。

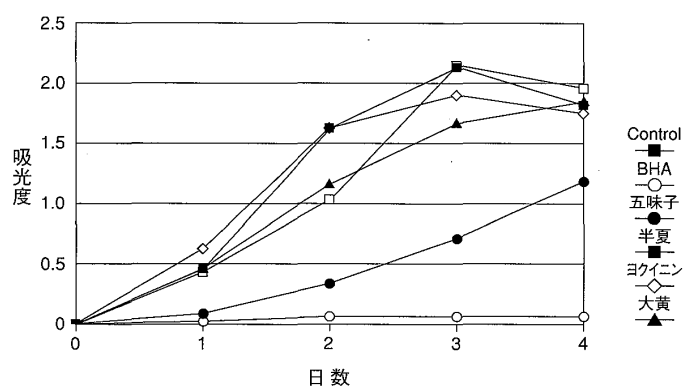


Fig. 5. 各生薬のリノール酸に対する抗酸化活性(ロダン鉄法)

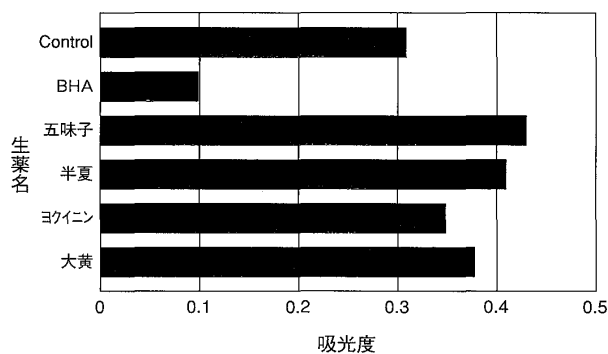


Fig. 6. 各生薬のリノール酸に対する抗酸化活性(TBA法)

## 2. 総フェノール量の定量

Folin-Ciocalteu法による各試料の総フェノール量はFig.7に示した没食子酸標準液による検量線 ( $y=0.0110x$ ) から没食子酸相当量として算出した。Fig.8に各生薬(乾燥)の中の総フェノール量として示した。これによると大黄, 黄芩, 艾葉などにフェノール性物質が多く含まれている。

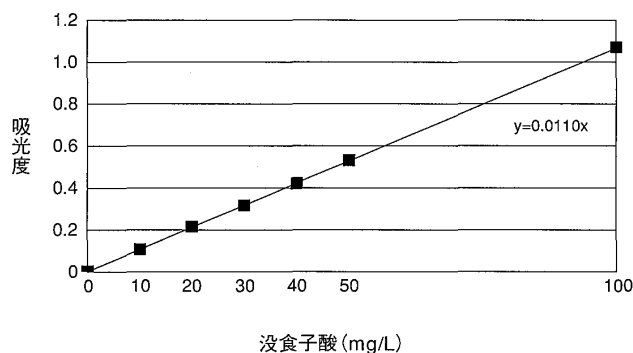


Fig. 7. 没食子酸標準液検量線

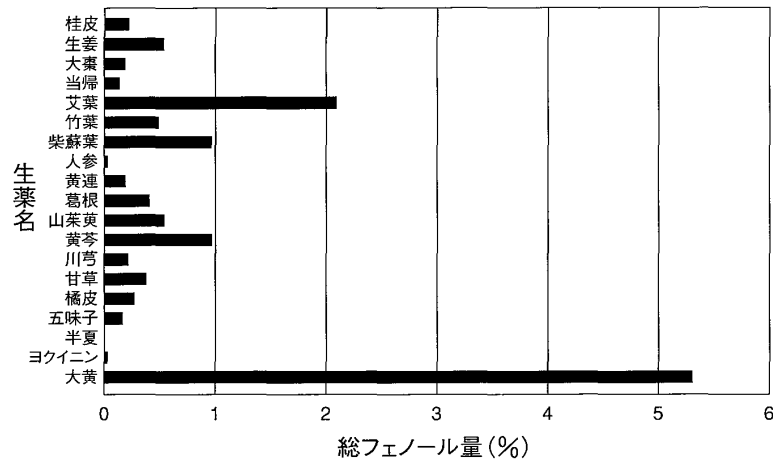


Fig.8. Folin-Ciocalteu 法による各生薬(乾燥)中の総フェノール量(没食子酸として)

### 3. フェノール性物質の確認

各試料の TLC 展開後, 長波長紫外線 (365 nm) 照射下で観察を行った。その一部を Table 1-1, 1-2 に示した。人参, 五味子, 半夏, ヨクイニン, 大黄にスポットはみられなかった。Rf 値およびスポット数は, 桂枝, 生姜は 0.8 以上に 2 点, 大棗は 0.7 付近に 1 点, 当归, 黄連は, ほぼ 0.5 以上にそれぞれ 6 点, 川芎は同じく 3 点, 山茱萸は 0.2 以下に 2 点, その他艾葉は 8 点, 竹葉, 葛根は 5 点, 紫蘇葉, 甘草は 7 点, 橘皮は 6 点であった。なお, スポットは青から

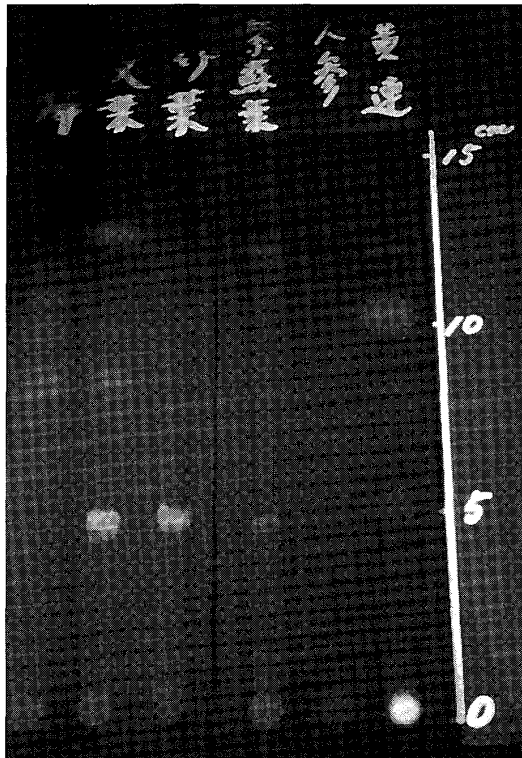


Table 1-1. 当帰, 艾葉, 竹葉, 紫蘇葉, 人参, 黄連(左より)の薄層クロマトグラム

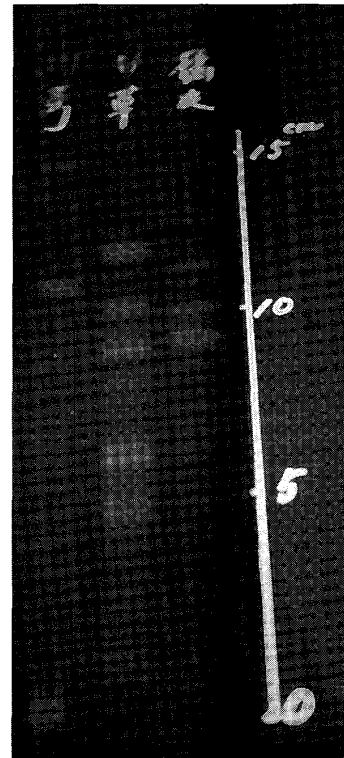


Table 1-2. 川芎, 甘草, 橘皮(左より)の薄層クロマトグラム

紫色の蛍光色が多かったが、艾葉、竹葉、紫蘇葉は、0.1~0.4の同一付近4点に赤色のスポットがみられた。ここでは明瞭なスポットがみられなかった黄芩のみが2%塩化第二鉄水溶液を噴霧した結果、灰色および赤みを帯びたフェノール性物質とみられる2スポットが検出された。

今回は、フェノール性物質の確認までは至らなかったが、TLCの展開剤や発色剤を変えてフェノール化合物、アルデヒド及びケトン、インドール誘導体等の検出、標品を用いての確認を行う必要がある。今後、他の生薬や、生薬を煎じた水溶液中に浸出される物質の抗酸化活性について検討する予定である。

生薬に含まれている成分<sup>4)</sup>で、抗酸化作用の知られているものには、フラボノイド、タンニン、リグナンなどのフェノール成分、サポニン、アルカロイド、テルペノイドなどがある。

過酸化水素に紫外線を照射して生じるヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )、これは最も危険な活性ラジカルであるが、これに対するフラボノイド類によるラジカルの除去効果は、S.R.Husainらの報告<sup>11)</sup>によるとフラボンよりフラボノールの方が大きく、フラボノールの中でもその活性の強さは、ミリセチン、ケルセチン、ラムネニン、モリンとなり、その他ジオスメチン、ナリンゲニン、アピゲニン、カテキン、5, 7-ジヒドロキシ-3', 4', 5'-トリメトキシフラボン、ロビニン、ケンフェロール、フラボンの順となっている。これらの構造上の理由は、B環の水酸基数、特にC-3'の水酸基数の有無によること、ケンフェロールの配糖体ロビニンとケンフェロールとにその活性はほぼ似ている、C-2とC-3の二重結合は活性とは関係がうすいこと、C-3の水酸基数は活性に寄与していないこと、また、C-3のメチル化や糖との結合はフラボノイドの抗酸化活性を高めてはいないことなどがあげられている。しかし、リノール酸メチルの自動酸化に対するフラボノイドの抑制効果はB環に水酸基数を2~3個もち、C環の2, 3位に二重結合、3位に水酸基数をもつものが安定なラジカル種を与えるため効率が良いとしている報告<sup>12)</sup>もある。フラボノイド系のケルセチン、ミリセチン、そしてルチンなどが酵素系、非酵素系で生成されるスーパーオキシドアニオンの濃度を下げることが報告<sup>13)</sup>されている。ケルセチン<sup>14)</sup>は、大豆のリポキシゲナーゼによるリノール酸の酸化を阻害するが、中間体として生成したリノール酸ラジカルによってその阻害効果は減少する。しかしこの時、アスコルビン酸が存在すると、アスコルビン酸が酸化されて、ケルセチンが酸化されるのをふせぐとの報告<sup>14)</sup>がある。

タンニンは多くの生薬に含まれており、ゲンノショウコその他、ここで取り上げた生薬の中では桂皮、大黃、紫蘇葉、艾葉、山茱萸などに含まれている。紫蘇葉のロスマニク酸は、葉の乾燥条件によって、またゲンノショウコのゲラニジンは煎出条件によって浸出液中に含まれるそれぞれの含量が異なる<sup>15)</sup>という。タンニンによる抗酸化性は、安定なラジカル種を与える方が抗酸化性が高く、したがって低分子ポリフェノールである没食子酸、ピロガロール、カテキンはその活性が低いとの報告<sup>12)</sup>がある。また、ラット肝ミトコンドリアやマイクロゾームでの脂質過酸化を強く抑制しており<sup>16)</sup>、リノール酸メチルの自動酸化に対するタンニンの抑制効果は、構成ポリフェノールの違いにより異なることが報告<sup>17,18)</sup>されている。また、この時共存するCu(II)の濃度によって酸化が促進も抑制もされることもしられている<sup>19)</sup>。

今回用いた生薬のうち黄芩には、黄芩抽出物やその中に含まれているバイカリンやオーゴニンなどのフラボノイド成分が、ラットの肝臓ミトコンドリアやマイクロソームの脂質過酸化を抑制しているとの報告がある<sup>20)</sup>。

甘草には、主要成分の一つであるサポニン<sup>21)</sup>のグリチルリチンや、トリテルペン配糖体、その他多くのフェノール性成分が見いだされており、抗菌、抗変異原作用、アラキドン酸代謝に対する影響や、血小板凝集阻害作用などが知られている<sup>22)</sup>。甘草<sup>21)</sup>に含まれるフラボノイド、サポニン成分の種類は、産地や部位で異なっている。これらのフェノール性化合物の中のリコカルコン A やリコカルコン B などがキサンチンオキシダーゼ(XOD)の活性を阻害し、またリコクマロンやグリトルイソフラボンがモノアミノオキシダーゼ(MAO)の酵素活性を阻害するとの報告<sup>23,24)</sup>がある。

タケ・ササ類<sup>25)</sup>の葉や茎からは、フラボン C 配糖体及び O 配糖体、リグニンなどのポリフェノールが含まれている。

柑橘系では、イヨ果皮中<sup>26)</sup>からペンタメトキシフラボンを始め 8 種のフラボノイドアグリコン、ハッサクからはヘスペリジン、ナリンギン、ロイフォリンなどのフラボノイド成分が単離されている。レモン、温州みかん、キンカン果皮<sup>27)</sup>からはコニフェリン、シリンギン、デヒドロジコニフェリルアルコール-4- $\beta$ -グルコシド、シトラシン A, B, C, D などのプロパノイド配糖体が、その他の柑橘類果皮<sup>28)</sup>からもフラボノイド配糖体が分離されている。これらの多くの成分には血圧降下作用が見いだされている。

その他、黄連にはベルベリンなどのアルカロイドや微量のタンニンが、葛根にはダイジン、ダイゼイン、プエラリン、プエラリンキシロシドなどのイソフラボンが、ケンフェロールラムノシド、ロビニンなどのイソフラボンが、桂皮にはオイゲノールやフロバタンニンが、艾葉にはタンニンが、山茱萸には、没食子酸が、川芎にはフェニクラリン(ケルセチン+アラビノース)が、大黃にはレオタンニン酸、グルコガリン、没食子酸が、人参にはジンセノサイド R などのサポニンが含まれている<sup>29)</sup>。この他五味子に含まれているゴミシン A, シザントリンなどのリグナンは、脂質過酸化を強く抑制するといわれており<sup>4)</sup>、また、生姜の抗酸化性には前報<sup>5)</sup>で述べたが、ジゲロール、ジゲロンが関与しているといわれている。

#### IV ま と め

(1)前回報告<sup>5)</sup>した 9 種類の生薬と、新たに葛根、山茱萸、黄芩、川芎、甘草、橘皮、五味子、半夏、ヨクイニンの計 19 種の抗酸化活性を検討した。

(2)ロダン鉄法では、当帰、山茱萸、大棗、桂枝、生姜、艾葉、紫蘇葉、竹葉、甘草、橘皮、黄芩が、TBA 法では当帰、艾葉、桂枝、生姜、竹葉、大棗、紫蘇葉、甘草、橘皮などに抗酸化活性がみられた。

(3)Folin-Ciocalteu 法によって各生薬(乾燥)中の総フェノール量を定量したところ大黃、黄芩、艾葉に多く含まれていた。



## 文 献

- 1) 大澤俊彦：天然抗酸化剤，日本農芸化学会誌，**62**，166-169 (1988)
- 2) 中谷延二：最近の抗酸化性物質の研究，日本食品工業学会誌，**37**，569-576 (1990)
- 3) 中谷延二：天然抗酸化性物質—香辛料を起源として，日本農芸化学会誌，**62**，170-173 (1988)
- 4) 奥田拓男：薬物代謝，抗酸化物質—フリラジカルと生体防御—(仁木鋭雄，島崎弘幸，美濃真編)，学会出版センター，262-275 (1994)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) E.Stahl, and P.J.Schorn : *Z.physiol.Chem.*, **325**, 263 (1963)
- 8) R.W.Keith, D.le Turneau and D.Mahlum : *J.Chromatog.* **1**, 534 (1958)
- 9) 柴田村治：ペーパークロマトグラフ法の実際，共立出版，1966
- 10) 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
- 11) S.R.Husain, J.Cillard and P.Cillard : Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, *Phytochem.*, **26**, 2489-2491 (1987)
- 12) 藤田勇三郎，戸川圭子，吉田隆志，波田野力，奥田拓男：タンニン及びフラボノイドによる抗酸化作用のメカニズム，和漢医薬学会誌，**2**，674-675 (1985)
- 13) J.Robak and R.J.Gryglewski : Flavonoids and Scavengers of Superoxide anions, *Biochem.Pharmacol.*, **37**, 837-443 (1970)
- 14) U.Takahama : Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin, *Phytochemistry* **24**, 1443-1446 (1985)
- 15) 奥田拓男，羽多野力，縣功，西部三省：シソ科の植物のタンニン活性成分(第1報)，薬誌，**106**，1108-1111 (1986)
- 16) T.Okuda, K.Yoshiyuki, T.Yoshida, T.Hatano, H.Okuda and S.Arichi : Studis on activities of tanninns and related compounds from medical plants and drugs. I , *Chem Pharm Bull.*, **31**, 1625-1631 (1983)
- 17) 吉田隆志，波多野力，戸川圭子，藤田勇三郎，奥田拓男：タンニン及びフラボノイドによるリノール酸メチル等の酸化抑制効果，和漢医薬学会誌，**2**，672-673 (1985)
- 18) 駒越圭子，丹羽ゆかり，上原郁恵，原令子，森廣美，奥田拓男，吉田隆志：タンニン及びフラボノイドによる自動酸化抑制機構 (第3報)，薬誌，**108**，528-537 (1988)
- 19) 藤田勇三郎，駒越圭子，上原郁恵，森廣美，原令子：タンニン及びフラボノイドによる自動酸化抑制機構 (第4報)，薬誌，**108**，625-634 (1988)
- 20) Y.Kimura, M.Kubo, T.Tani, S.Arichi and H.Okuda : Studies on Scutellariae Radix.

- IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver, *Chem Pharm Bull.*, **29**, 2610-2617 (1981)
- 21) 北川勲, 陳偉衆, 谷山登志男, 原田英美子, 堀一之, 小林資正, 任家礼: 各種甘草含有成分の HPLC による定量分析, *薬誌*, **118**, 519-528 (1998)
- 22) 波多野力, 福田寿之, 劉延澤, 野呂忠敬, 奥田拓男: 甘草のフェノール性成分(第4報), *薬誌*, **111**, 311-321 (1991)
- 23) T.Hatano, T.Yasuhara, T.Fukuda, T.Noro and T.Okuda: Phenolic constituents of licorice. II, *Chem Pharm Bull.*, **37**, 3005-3009 (1989)
- 24) T.Hatano, T.Fukuda, T.Miyase, T.Noro and T.Okuda: Phenolic constituents of licorice. III, *Chem Pharm Bull.*, **39**, 1238-1243 (1991)
- 25) 田中信壽, 和田浩志, 瀧野裕之, 井上猛, 安田大輔, 神田秀一郎, 清川千晶, 芦田憲昭, 鈴木崇史, 山崎浩平, 袴塚高志: タケ・ササ類の成分研究, *薬誌*, **118**, 332-337 (1998)
- 26) 町田浩一, 大沢啓助: イヨ果皮中のフラボノイド成分, *日本農芸化学会誌*, **62**, 1777-1779 (1988)
- 27) 沢辺昭義, 松原義治, 飯塚義富, 岡本耕造: レモン (*Citrus limon Burum f.*) およびキンカン (*Fortunella japonica*) 果皮中のフェニルプロパノイド配糖体の構造と生理活性, *日本農芸化学会誌*, **62**, 1067-1071 (1988)
- 28) H.Kumamoto, Y.Matsubara, Y.Iizuka, K.Okamoto and K.Yokoi: Structure and Hypotensive Effect of Flavonoid Glycosides in Orange (*Citrus sinensis OSBECK*) Peelings, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 781-783 (1986)
- 29) 伊沢凡人: 原色日本薬用植物事典 1~4, 誠文堂新光社, 1967