

天然物中の水溶性抗酸化因子及び脂溶性抗酸化因子による抗酸化作用の評価

宇佐美英治,^{*,a} 草野源次郎,^b 片寄貴則,^c 輪千浩史,^c 瀬山義幸,^c

Assessment of Antioxidant Activity of Natural Compound by Water- and Lipid-soluble Antioxidant Factor

Eiji USAMI,^{*,a} Genjiro KUSANO,^b Takanori KATAYOSE,^cHiroshi WACHI,^c and Yoshiyuki SEYAMA^c

Chigasaki Municipal Hospital,^a 5-15-1 Honson, Chigasaki 253-0042, Japan, Osaka University of
Pharmaceutical Sciences,^b 4-20-1 Nasahara, Takatsuki 569-1094, Japan, and Faculty
of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University,^c 2-4-41 Ebara,
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received April 15, 2004; Accepted August 3, 2004)

We evaluated the antioxidant activity of natural compounds in water-soluble and lipid-soluble phases and found that ferulic acid, quercetin and caffeic acid showed stronger activity in the water-soluble phase. Various fractions isolated from *Bidens pilosa* showed this activity mainly in the water-soluble phase. Antioxidant activity in the lipid-soluble phase of propolis depended on the lipophilic extraction.

Key words—antioxidant activity; *Bidens pilosa*; propolis

緒 言

天然成分には多くの抗酸化物質が存在することが知られている。特に、ポリフェノールやプロポリスの抗酸化作用に関しては多くの論文に報告^{1,2)}されており、この多くは水溶性溶媒中において水溶性因子による抗酸化作用が測定されている。^{3,4)}しかし、天然物中の抗酸化物質は水溶性成分のみならず多くの脂溶性成分も含まれている。このため、天然成分に含まれる抗酸化物質の総合的な抗酸化作用を知るためには、水溶性及び脂溶性抗酸化因子による抗酸化作用をそれぞれ測定して総合的に評価する必要がある。

そこで、筆者らは Tubaro らの方法⁵⁾で用いられた水溶性、脂溶性の両方の溶媒系に溶解するクロシンを指標にし、水溶性アゾ化合物（以下 ABAP）又は脂溶性アゾ化合物（以下 AMVN）により極性の異なるラジカルを発生させることにより、同一の成分に対する水溶性及び脂溶性溶媒中における水溶

性因子及び脂溶性因子による抗酸化作用を相対的に評価した。また、抗酸化作用を示す標準品として、水溶性、脂溶性の両溶媒系に溶解する Trolox C を用いた。

本実験においては、ビデンスピローサ抽出分画とプロポリス原末から抽出溶媒比を変えて得たプロポリス抽出物の抗酸化作用について、水溶系、脂溶系における抗酸化作用の評価を行ったのでその結果を報告する。

実 験 の 部

1. 試薬並びに試料 サフランは Sigma Chemical Co. 製のものを用了。2,2'-Azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (ABAP), 2,2'-Azobis (2,4'-dimethylvaleronitrile) (AMVN), アスコルビン酸, 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (以下エダラボン), α -tocopherol, shikonin, glutathione, カフェ酸, フェルラ酸, クエルセチンは和光純薬工業(株)製の特級試薬を用了。6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (Trolox C) は Aldrich Chem. Co. 製のものを用了。

ビデンスピローサのカラム分画液は前報⁶⁾に従

^{a)} 茅ヶ崎市立病院薬局, ^{b)} 大阪薬科大学生薬学教室,

^{c)} 星薬科大学臨床化学教室

e-mail: kusuri@mqi.biglobe.ne.jp

い、沖縄県宮古島で自生する *Bidens pilosa* L. var. *Radiata* Scherff (和名タチアワユキセンダングサ) を圃場で無農薬栽培し、刈り取った地上部を洗浄、裁断、蒸煮、圧さく、揉解、乾燥行程を経たものを原料とし(原材料名: 宮古ビデンスピローサ, 特許第 3425918 号, ロット No. 2000.9.8, 武蔵野免疫研究所提供), 原料 500 g を 3.5 l の水で 3 回、還流下に抽出し、600 ml のダイヤイオン HP-20 カラムに通して水 500 ml で洗浄した。さらにカラムを 50% メタノール 250 ml, ついでメタノール 250 ml で溶出した。この溶出液を合わせて、その 250 ml を 70 g の ODS カラムに吸着させ、10% 及び 20% メタノール各 100 ml (合せて画分 A-1), 30% メタノール 100 ml (画分 A-2), 40% メタノール 100 ml (画分 A-3), 50% メタノール 100 ml (画分 A-4), 及びメタノール 100 ml (画分 A-5) で段階的にクロマト溶出してそれぞれ分画した。各画分の溶媒を除去した後、メタノールに溶解し 1 mg/ml の試料溶液を作成した。

プロポリス抽出液はブラジル産アレクリン (alecrin) 種を原材料として CELSO DALL AGNOL com. で製造されたものをピスピー生活科学研究所より供与されたプロポリス原末より抽出した。

クロシン溶液はサフラン 0.5 g にジエチルエーテル 5 ml を加え激しく攪拌したのち、遠心分離し上清を除去した。この操作を 5 回繰り返した。残渣にメタノール 5 ml を加えクロシンを抽出した。抽出したクロシン溶液の濃度は $A_{443} = 1.33 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ より求めた。

2. 方法

2-1. 水溶性ラジカルに対する抗酸化作用の測定⁵⁾ 抽出したクロシン溶液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて希釈し 10 μM クロシン溶液を作成した。40°C の恒温セルに 10 μM クロシン溶液 2.0 ml と試料 100 μl を加えたのち、0.5 M ABAP 溶液 50 μl (最終濃度 12.5 mM) を加え軽く攪拌したのち、443 nm における吸光度を 10 分間測定し、5 分から 10 分の間の吸光度変化について 1 分間当たりの平均減少吸光度を求めた。

2-2. 脂溶性ラジカルに対する抗酸化作用の測定⁵⁾ 抽出したクロシン溶液をジメチルホルムアミド溶液にて希釈し 10 μM クロシン溶液を作成した。40°C の恒温セルに 10 μM クロシン溶液 2.0 ml と試料 100 μl を加えたのち、1.0 M AMVN 溶液 50

μl (最終濃度 25 mM) を加え軽く攪拌したのち、443 nm における吸光度を 10 分間測定し、5 分から 10 分の間の吸光度変化について 1 分間当たりの平均減少吸光度を求めた。

方法 1), 2) における各試料の抗酸化作用は次式より K_a/K_c を求め、1 mM Trolox C 当たりに換算して表した。

$$V_o/V = (K_c[C] + K_a[A])/K_c[C]$$

V: 抗酸化剤を加えた時の吸光度の減少速度

V_o : 抗酸化剤を加えない時の吸光度の減少速度

[C]: クロシン溶液の濃度

[A]: 抗酸化剤の濃度

K_c : 発生したラジカルとクロシンとの反応速度定数

K_a : 発生したラジカルと抗酸化物質との反応速度定数

2-3. プロポリス原末からのプロポリス抽出液の作成 プロポリス原末 1 mg に水、水: メタノール = 3: 1, 水: メタノール = 1: 1, 水: メタノール = 1: 3, メタノール各 1 ml を加え、常温で 5 分間振とうして抽出し、その上清を試料とした。

結 果

1. 既存の抗酸化物質の抗酸化作用の測定 アスコルビン酸とグルタチオンは脂溶性の溶媒に不溶なため水溶性溶媒中においてのみ抗酸化作用の測定が可能であった (アスコルビン酸は 8.72 mM Trolox C 当量, グルタチオンは 0.36 mM Trolox C 当量)。逆に, α -Toc は水溶性溶媒に不溶なため脂溶性溶媒中においてのみ抗酸化作用の測定が可能であった (1.43 mM Trolox C 当量)。臨床的に脳梗塞後の後遺症に使用されるエダラボンは水溶性溶媒中の抗酸化作用 (0.11 mM Trolox C 当量) より脂溶性溶媒中において強い抗酸化作用 (1.93 mM Trolox C 当量) を示し、この和で示した総当量では α -Toc よりも強い活性 (2.04 mM Trolox C 当量) を示した。また、前報においてビデンスピローサ中の抗酸化物質であるフェルラ酸、ケルセチン、カフェ酸は ABAP から生じる水溶性ラジカルに対して強い抗酸化作用を示した。特にケルセチンは相対的に強い抗酸化作用を示した (Table 1)。

2. ビデンスピローサの ODS カラム分離後画分の抗酸化作用の測定 画分 A-1—5 について水溶

Table 1. Antioxidant Activity of the Aqueous and Lipid-Soluble Fractions of Various Compounds Using Crosin Method

| | | Antioxidant activity (Trolox C equivalent mM) | | |
|----------------------|-----------|---|---------------------|-------|
| | | Water-soluble phase | Lipid-soluble phase | Total |
| Trolox C | (1 mM) | 1.00 | 1.00 | 2.00 |
| α -Tocopherol | (1 mg/ml) | 0 | 1.43 (100) | 1.43 |
| Ascorbic acid | (1 mg/ml) | 8.72 (100) | 0 | 8.72 |
| Shikonicin | (1 mg/ml) | 0.73 (47.7) | 0.80 (52.3) | 1.53 |
| Glutathione | (1 mg/ml) | 0.36 (100) | 0 | 0.36 |
| Edaravone | (1 mg/ml) | 0.11 (5.4) | 1.93 (94.6) | 2.04 |
| Ferulic acid | (1 mg/ml) | 1.93 (91.5) | 0.18 (8.5) | 2.11 |
| Quercetin | (1 mg/ml) | 15.56 (89.4) | 1.85 (10.6) | 17.41 |
| Caffeic acid | (1 mg/ml) | 5.84 (93.1) | 0.43 (6.9) | 6.27 |

Numbers in parenthesis present the % ratio between aqueous and lipid-soluble layers.

Table 2. Antioxidant Activity of the Aqueous and Lipid-Soluble Fractions of Various Extracts from *Bidens pilosa* Using Crosin Method

| Antioxidant activity (Trolox C equivalent mM) | | | |
|---|---------------------|---------------------|-------|
| Bidens pilosa Fr. | Water-soluble phase | Lipid-soluble phase | Total |
| Fr.A-1 | 1.72 (80.0) | 0.43 (20.0) | 2.15 |
| Fr.A-2 | 2.54 (87.0) | 0.38 (13.0) | 2.92 |
| Fr.A-3 | 3.05 (87.6) | 0.43 (12.4) | 3.48 |
| Fr.A-4 | 1.30 (80.2) | 0.32 (19.8) | 1.62 |
| Fr.A-5 | 0.45 (55.6) | 0.36 (44.4) | 0.81 |

Numbers in parenthesis present the % ratio between aqueous and lipid-soluble layers.

性アゾ化合物並びに脂溶性アゾ化合物を用い抗酸化作用を測定した。その結果、水溶性抗酸化因子による抗酸化作用は前回と同様に画分 A-3 が最も強かった。しかし、各画分の脂溶性因子による抗酸化作用はほぼ同等であった (Table 2)。

3. プロポリスの抽出溶媒の極性の比率を変えた場合の抗酸化作用の測定 各抽出液の抗酸化作用を測定した結果、水溶性抗酸化因子による抗酸化作用は水：メタノール＝1：3 (1.66 mM Trolox C 当量) が最大であった (Table 3)。しかし、脂溶性抗酸化因子による抗酸化作用はメタノール抽出が 0.76 mM Trolox C 当量と最大であり、プロポリスの抗酸化活性は抽出溶媒の極性の低下に依存すると推測される。

Table 3. Antioxidant Activity of the Aqueous and Lipid-Soluble Fractions of Several Propolis Extracts Using Crosin Method

| Antioxidant activity (Trolox C equivalent mM) | | | |
|---|---------------------|---------------------|-------|
| Water : MeOH | Water-soluble phase | Lipid-soluble phase | Total |
| 1 : 0 | 1.12 (75.2) | 0.37 (24.8) | 1.49 |
| 3 : 1 | 1.06 (70.2) | 0.48 (31.2) | 1.54 |
| 1 : 1 | 1.58 (76.0) | 0.50 (24.0) | 2.08 |
| 1 : 3 | 1.66 (74.8) | 0.56 (25.2) | 2.22 |
| 0 : 1 | 1.39 (64.7) | 0.76 (35.3) | 2.15 |

Numbers in parenthesis present the % ratio between aqueous and lipid-soluble layers.

考 察

生体内で発生する水系のフリーラジカルとしてはスーパーオキシドラジカルがあるが、これは過酸化水素と反応してヒドロキシラジカルを生じ、脂質から水素を引き抜いて脂質ラジカルを発生し連鎖反応により脂質の過酸化を引き起こす。このように、生体内で発生したフリーラジカルは水溶性ラジカルから脂溶性ラジカルへの相互変換がなされるため、どちらか一方のフリーラジカルを消去するだけでは十分な抗酸化剤とは言えない。また、生体内において水溶性の抗酸化物質は主に細胞外液に存在し水溶性ラジカルを捕捉し、脂溶性抗酸化物質は主に細胞膜に存在し脂溶性ラジカルを捕捉する。このため、抗酸化物質の抗酸化作用は存在部位も含め極性が大きな要因となる。今回、クロシンを用いることにより、同一物質の抗酸化作用を水溶性、脂溶性の両溶媒系において水溶性因子と脂溶性因子の抗酸化作用を相対的に評価することが可能になり、また標準品として Trolox C を用いることで相対的かつ総合的な抗酸化作用を表現することができた。

Russo ら²⁾はプロポリス中の抗酸化作用を示す物質の内、カフェ酸が大きな役割を担っていると述べているが、本実験ではクエルセチンの方が相対的に大きな抗酸化作用を持つ物質であることが明らかになった (Table 1)。また、Cao ら⁷⁾は、われわれが抗酸化作用の標準物質として使用した Trolox C とアスコルビン酸の抗酸化作用の比を 1 : 0.52 と報告しているが、本測定では 1 : 4.36 であった。

前報⁶⁾においてビデンスピローサ画分の水溶性ラジカル消去活性について報告したが、今回は脂溶性

溶媒中における抗酸化作用もあわせて測定し、その結果、ODS カラムによる分離は脂溶性ラジカルを捕捉する物質の分離にはほとんど影響しないことが分かった。

また、相対的な抗酸化作用は画分 A-4 並びに A-5 が強いことが分かった。画分 A-4 と A-5 にはカフェタンニンやクエルセチンが多く含まれており、Table 1 の結果から考察して、この分画の抗酸化作用はこれらの成分の寄与が大きいと考えられる。

また、プロポリスの原末からメタノール：水の比率を変えて抽出する実験において、Table 3 に示すようにメタノール：水の比率が 1：1 から 1：3 の場合に特に水溶性ラジカルを消去する活性が高まることが分かった。したがって、プロポリス製剤の抗酸化作用を高めるためには抽出溶媒の極性を考慮する必要があると思われる。

以上、クロシンを用いて水溶性、脂溶性溶媒中における抗酸化作用を測定することにより総合的な抗酸化作用を比較することができるようになった。この方法は様々な抗酸化物質が混在する物質、特に天然抽出物などの抗酸化作用を評価する場合には有効

な方法であると思われる。

今後、本法はプロポリスやビデンスピローサのような天然物の抗酸化作用を測定し、この品質管理を行う場合にも応用が可能であると考えられる。

REFERENCES

- 1) Plumb G. W., Price K. R., Rhodes M. J., Williamson G., *Free Radic. Res.*, **27**, 429–435 (1997).
- 2) Russo A., Longo R., Vanella A., *Fitoterapia*, **73** Suppl. 1, S1–S9 (2002).
- 3) Plumb G. W., Price K. R., Williamson G., *Redox Rep.*, **4**, 123–127 (1999).
- 4) Plumb G. W., Price K. R., Williamson G., *Redox Rep.*, **4**, 13–16 (1999).
- 5) Tubaro F., Ghiselli A., Rapuzzi P., Maiorino M., Ursini F., *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1228–1234 (1998).
- 6) Kusano A., Seyama Y., Usami E., Katayese T., Shibano M., Tsukamoto D., Kusano G., *Nat. Med.*, **57**(3), 100–104 (2003).
- 7) Cao G., Alessio H. M., Cutler R. G., *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 303–311 (1993).