

山椒果実由来の抗酸化物質について

山崎 栄次*, 稲垣 穰**, 井上 哲志*, 柏村 直樹**

Extraction of Antioxidants from *Zanthoxylum Piperitum* DC.

by Eiji YAMAZAKI, Minoru INAGAKI, Tetsuji INOUE
and Naoki KASHIMURA

The antioxidants were extracted from *Zanthoxylum Piperitum* DC. and the properties were investigated. The extracts were found to be stable at relatively high temperature treatment (120°C, 20 min) from acidic condition (pH 3.5) to neutral condition (pH 7.0). Seven fractions were purified from the extract by the preparative reversed phase HPLC system and the antioxidative activity of each fraction in the ethanol-linoleic acid autoxidation system was equal to that of α -tocopherol, a natural effective antioxidant. The scavenging activity of the fraction A, one of the seven fractions, with hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$) was evaluated by electron spin resonance (ESR) spin-trapping using 5,5-dimethyl-1-pyrrolyne-N-oxide (DMPO). The fraction A scavenged $\text{HO}\cdot$ more than 75% effectively at very low concentration (480 ng/ml).

Key words: *Zanthoxylum Piperitum* DC., antioxidant, radical scavenge, ESR

1. はじめに

食品に含まれる脂質の過酸化は、食品の変色、過酸化臭の発生等を伴い、食品の品質低下の大きな原因の一つである。また過酸化脂質の蓄積は、食品の品質低下だけでなく、生体組織を攻撃し、生活習慣病をはじめ様々な疾病の発症、さらに老化の促進を引き起こすことが、近年の研究の結果から明らかになってきた¹⁻³⁾。

食品の酸化による品質低下抑制を目的として、従来からビタミンのascorbic acidや α -tocopherol等が用いられてきた。しかし、ascorbic acidは水溶性であり、脂溶性の脂質に対する抗酸化能力は期待できない。また α -tocopherolは植物油脂中にすでに高濃度溶解しており⁴⁾、新たな添加による抗酸化能力の増強は期待しがたい。このように、食品の加工、流通そして保存の各段階においてこれらの抗酸化物質のみで十分とはいえない。一方、化学合成抗酸化物質であるブチルヒドロキソトル

エン (BHT) やブチルヒドロキシアニソール (BHA) は、非常に強い抗酸化能力を発揮することで知られているが、発ガン性等の生体への影響が懸念され、食品への使用が控えられる傾向にある。以上の理由と、安全性への強い関心から天然由来の抗酸化物質の探索が盛んに行われている⁵⁻⁶⁾。特に、食品として従来から利用されている植物由来のフラボノイドや桂皮酸類縁体、総じてポリフェノールと呼ばれる物質が、天然の強い抗酸化物質として期待されている⁷⁾。

山椒はミカン科に属する落葉灌木で、日本の各地に自生及び植林されており、植物全体に特有の強い香りがあり、果皮には特有の強い辛味がある。果皮中には、香り成分のサンシオールやシトラネオール等の製油数%を含む。主な産地は、紀伊半島、岐阜県、兵庫県の西日本が中心である。果実は長さ約5 mmの広い楕円形で、秋完熟して外皮に紅がさしてくると外皮が二分裂し、その中から黒色の種子が出現する。その果実を摘み取り、陰干ししてよく乾燥させた後、種子を除去して果皮をスパイスとして利用する。また、胃腸の働きの

* 生物食品グループ

** 三重大学生物資源学部

改善を目的に漢方としても古くから利用されているが、抗酸化能力に関連した報告は少ない。我々は ascorbic acid や α -tocopherol に代わる抗酸化物質を、食品として広く利用されている農林水産物を対象に探索したところ、山椒果実メタノール抽出物 (methanol extract) に強い抗酸化能力が認められたので報告する。

2. 方法と原材料

2. 1 原材料

山椒 (*Zanthoxylum Piperitum* DC.) は、紀州産を伊勢粉材株式会社 (三重) から提供された。linoleic acid と α -tocopherol, diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC), 過酸化水素 (hydrogen peroxide) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。ESR分析試薬のDMPOはLabotec株式会社 (東京) から購入した。他の試薬は市販の特級試薬を使用し、特に精製せずにそのまま使用した。

2. 2 方法

2. 2. 1 山椒由来の抗酸化物質の抽出

山椒由来の抗酸化物質は、山椒果実粉末より抽出した。山椒果実粉末 100 g に 500 ml のメタノール (methanol) を加え、室温・暗条件下で一晩振とうした。孔径 0.45 μ m のろ紙を用いてろ過し、抽出液を得た。残渣についてメタノールによる抽出作業を 3 回繰り返す。抽出液約 2 L を得た。抽出液に水を加え、80 % methanol 溶液に調製し、分液ロートに移した。低極性物質のテルペノイド (terpenoid) や脂質を除去する目的で、n-hexane によって分配・分液した。n-hexane 層を除去し、water-methanol 層を減圧濃縮し、methanol extract 5.8 g (湿重量) を得た。この methanol extract を 30 % methanol に溶解し、カラムクロマトグラフ (ϕ 22 mm \times 190 mm, Wakosil 25C18 和光純薬工業株式会社 (大阪)) の試料とした。1 ml/min, 60 分間 20 % methanol で溶出し、次に 1.5 ml/min で 240 分間、30–60 % methanol 溶液でグラジエント溶出を行い、さらに 1.5 ml/min で 100 分間、60–99.9 % methanol 溶液でグラジエント溶出した。検出は波長 350 nm の紫外吸収で行った。

2. 2. 2 抗酸化能力の測定

抗酸化能力は linoleic acid の自動酸化を利用し

たエタノール-リノール酸系 (ethanol-linoleic acid system)⁸⁾ を採用した。すなわち試料を 100 μ g, linoleic acid を 0.13 ml, 99.9 % ethanol を 10 ml, 50 mM リン酸緩衝液 (Na) pH 7.0 を 10 ml 加え、蒸留水で全量を 25 ml に調製した。密栓付き三角フラスコで 40 $^{\circ}$ C に保温し、反応を行った。酸化の程度はチオシアン酸法⁹⁾ (thiocyanate method) を採用した。すなわち linoleic acid の自動酸化によって生じる過酸化脂質が Fe^{2+} を酸化し、 Fe^{3+} を生成する。この Fe^{3+} が thiocyanate と錯体を形成し、赤-黄色を呈する。この呈色反応を、吸光分光光度計を用いて 500 nm の吸収で測定した。コントロールとして 100 μ g の α -tocopherol を使用した。

2. 2. 3 Methanol extract の熱及び pH 安定性

pH は酢酸緩衝液 (Na) を使用して pH 3.5 と pH 5.0, リン酸緩衝液 (Na) を使用して pH 7.0 に調製し、methanol extract の終濃度を 1 mg/ml にした。これらの試験液を 80 $^{\circ}$ C で 60 分、121 $^{\circ}$ C で 20 分保持した。熱及び pH 安定性の評価は、熱処理溶液を linoleic acid-ethanol 系での抗酸化能力試験の試験液として用い、同 pH 溶液の非熱処理対象との比 (%) によって表した。

2. 2. 4 ヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) 消去能力の測定 (スピントラップ法)¹⁰⁾

過酸化水素 (H_2O_2) と硫酸鉄 ($FeSO_4$) とのフェントン反応 (Fenton reaction) によって $HO\cdot$ を生成させ、DMPO によってトラップされた $HO\cdot$ を ESR で観測した。すなわち、DMPO を 4.2×10^{-4} M, $FeSO_4$ を 3.4×10^{-4} M, DETAPAC を 3.4×10^{-4} M に調製した反応液に適当濃度に調製された試料を添加し、次いで H_2O_2 (3.3×10^{-3}) を加えた。試料の $HO\cdot$ 消去能力によって DMPO ラジカル ($DMPO\cdot$) の ESR シグナル強度が変化するのを観察した。ESR は JOEL JES-RE1X (東京), 実効体積 160 μ l の quartz flat cell を使用し、反応は室温で行った。試料の $HO\cdot$ 消去能力は、 Mn^{2+} を内部標準として用い、実効シグナル強度を算出し、試料添加時と無添加時の DMPO \cdot 由来の ESR シグナル強度比 (%) によって評価した。

3. 結果と考察

3. 1 山椒果実由来の抗酸化物質の抽出

山椒果実から強い抗酸化物質を得るため、抽出

条件を検討した。食品を中心に応用を検討した場合、水やアルコールにもある程度溶解することは、応用範囲が広がり非常に有利である。そのため、水やアルコールにも溶解するような中間極性を有する物質の抽出を目的とし、99% methanol で抽出作業を行った。また、同時に抽出されてくるテルペノイド (terpenoid) や脂質 (lipid) 等の低極性物質を除去するため、n-hexane によって脱脂・分配した。結果として 100 g の山椒果実粉末から約 5.8 g (湿重量) の methanol extract が得られた。methanol extract は、山椒特有の芳香を呈し、減圧濃縮によって茶褐色のシロップ状物質であった。徹底的に濃縮しても乾燥標品を得ることはできなかった。この methanol extract を methanol で希釈し、抗酸化能力の測定を行った。(図 1)

linoleic acid の自動酸化によって蓄積される過酸化脂質を、定期的に thiocyanate method によって抗酸化能力を評価した。抗酸化物質無添加のコントロールでは、経過時間に対し、過酸化脂質が蓄積されていくことがわかった。一方 methanol extract は、天然の強い抗酸化物質である α -tocopherol と同等の強い抗酸化能力を示した。抽出過程は、使用溶媒の低容量化及び操作の簡略化を念頭に検討を行ったが、methanol と n-hexane のみで粗抽出が行えた。データは示さないが、抽出溶媒を methanol から ethanol に変更して得られた ethanol 抽出液も、非常に強い抗酸化能力が認められた。

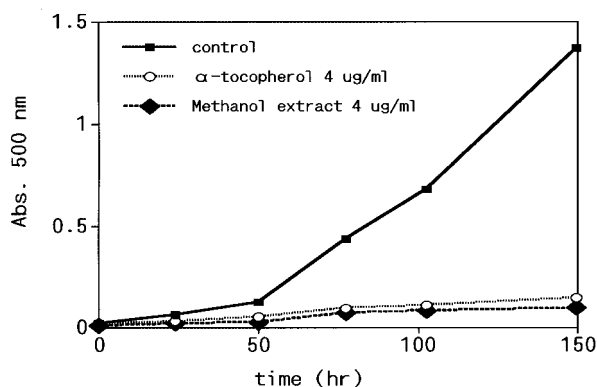


図 1 山椒果実メタノール抽出物の過酸化脂質に対する抗酸化能力

3. 2 methanol extract の pH 及び熱安定性

食品工業では品質の維持や保存性の向上を目的に、また調理過程で熱や pH を操作するので、耐

熱性や使用可能 pH 範囲は非常に重要である。このため、methanol extract を試料とし、レトルト殺菌を想定した 120 °C・20 分間処理、加熱工程を想定した 80 °C・60 分間の熱処理を、それぞれ pH 3.5, 5.0, 7.0 の三段階で検討した。処理後、ethanol-linoleic acid 系による抗酸化試験を行い、thiocyanate method によって抗酸化能力の評価を行った。抗酸化能力の判定は、抗酸化物質無添加のコントロール (熱処理等は行っていない) が thiocyanate method で吸光度がおおよそ 1.0 に達した時、各試料溶液の吸光度の差をコントロールの吸光度で割った値 (%) によって評価した。結果を図 2 に示す。

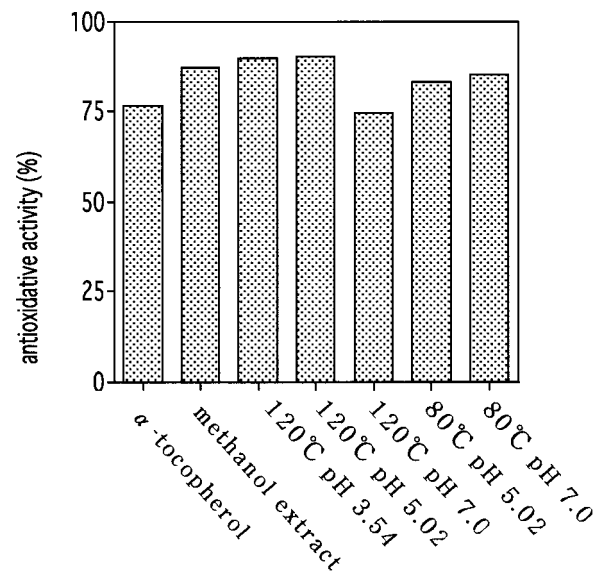


図 2 methanol extract の熱及び pH 安定性

methanol extract は、これらの処理によってほとんど影響を受けていないことがわかった (pH 3.5, 80 °C・30 分間処理試料は処理中に沈殿が析出し、ethanol-linoleic acid 系による分析が困難であったため、結果を示していない。今後他の測定方法を検討しなければならない)。pH が中性付近になると試料が黄色く変色する傾向がみられた。これは、methanol extract に存在するフラボノイド (flavonoid) が発色に関与していると考えられる (flavonoid は中性より pH を高くすると構造が変化し、吸収波長が長波長側にシフトする)。flavonoid は抗酸化能力が非常に強いことで知られているが、pH を高くすることに付随する発色によって、flavonoid の構造が不可逆的に変化し、抗酸化能力も影響を受けると考えられるので、抗

酸化を目的とした場合、中性以下で行うことが望ましいと考えられる。

3. 3 HPLCによる methanol extract の精製

methanol extract の精製を行うため、極性の高い物質から低い物質が順番に溶出される逆相モードでHPLCによる精製を検討した。water-methanol グラジエント溶出を行った結果を図3に示す。350 nm における吸収を指標に溶出パターンを観察したところ、分画Aを含む7分画が methanol 濃度の上昇によって、順番に溶出された。350 nm に吸収を有する物質はフラボン骨格を有する物質が (flavone) が主成分と考えられる。分画Aは flavone 類の特徴である、紫外線吸収部に2つの極大吸収ピークを有することがわかった。これらの分画を回収し、減圧濃縮した物を試料と

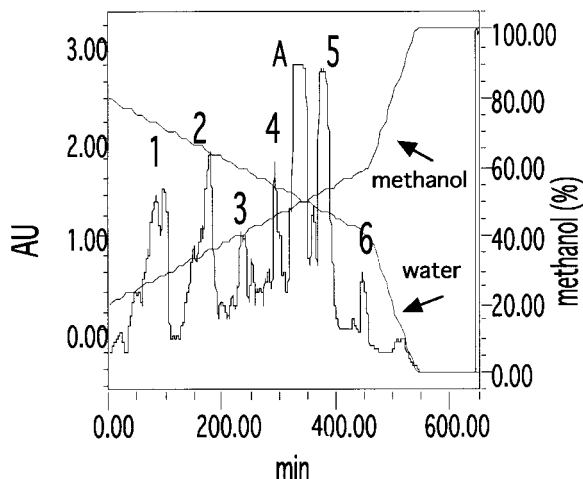


図3 逆相モードHPLCによるmethanol extractの精製

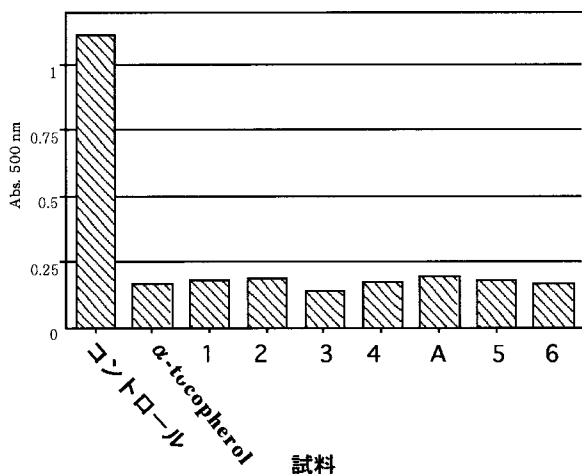


図4 methanol extract精製物の抗酸化能力

し, ethanol-linoleic acid 系の抗酸化能力を測定した結果を図4に示す。

抗酸化能力の評価は、抗酸化物質無添加のコントロールが、thiocyanate method の 500 nm の吸収で1に達した時測定終了とし、その時点における各分画の 500 nm の吸光度を比較した。Aを含む7つの分画はそれぞれ、 α -tocopherol と同等の抗酸化能力を有することがわかった。山椒果実由来の抗酸化物質は親水性から疎水性まで幅広く多数存在し、いずれも強い抗酸化能力を有することが確認できた。

3. 4 HO・消去能力の測定について

HPLCで分画して得られた分画Aを試料とし、HO・消去能力を、DMPOを用いたスピントラップ法 (spin-trapping method) で評価した。生体内におけるHO・の生成は、過酸化水素と鉄や銅の2価遷移金属との Fenton reaction が主要であるが、放射線や紫外線で生体内の水が活性化されて生成することもある。HO・は寿命が非常に短く、最も反応性の高い活性酸素種であり、タンパク質や遺伝子等の重要な生体成分を切断させたり、過酸化させたりする。HO・は非常に寿命が短いので、そのままESRで測定するのは非常に困難である。そこで、含窒素スピントラップ剤のDMPOにHO・をトラップし、比較的安定なDMPO・を形成させ、ESR測定を行った。反応系にラジカル消去剤が存在すると、DMPO由来のESRシグナル強度が減少する。活性酸素の消去率 (%) は次式で表した。

式:

$$\text{活性酸素消去率 (\%)} = \left(1 - \frac{H_{\text{samp}}/S_{\text{samp}}}{H_{\text{stand}}/S_{\text{stand}}} \right) \times 100$$

H_{stand} はコントロール (分画A無添加) のシグナル高, S_{stand} はコントロールの内部標準のシグナル高, H_{samp} は分画A添加時のシグナル高,



図5 分画AのESRを利用したヒドロキシルラジカル消去能力の測定

及び Ssamp は分画A添加時の内部標準のシグナル高を示す。

図5 Aは抗酸化物質無添加時のDMPO・のESRシグナル、図5 Bは分画Aが反応系に480ng/mlで添加してある場合のESRシグナルである。分画Aの存在によって、HO・が消去され、DMPO・のシグナル強度が減少していることがわかった。

図6に示すように、分画Aの濃度依存的にHO・消去能力が増加し、反応系に480 ng/ml 加えた場合、75%以上のHO・を消去した。flavonoidの標準的な質量範囲は数百~1000程度であることを考慮に入れると、480 ng/mlはおおよそ数 μ M程度と見積もられる。過去の報告ではラジカル消去剤濃度が数十 μ M程度でも消去能力が強いと評価を受けていた¹¹⁻¹²。ESRの測定条件が異なるが、ラジカル消去反応が定量的に行われ比較が可能であるとすると、分画AのHO・消去能力は非常に強い。今後質量分析計により、分画Aの質量を決定し、詳細にHO・消去能力の検討を行うことが必要である。

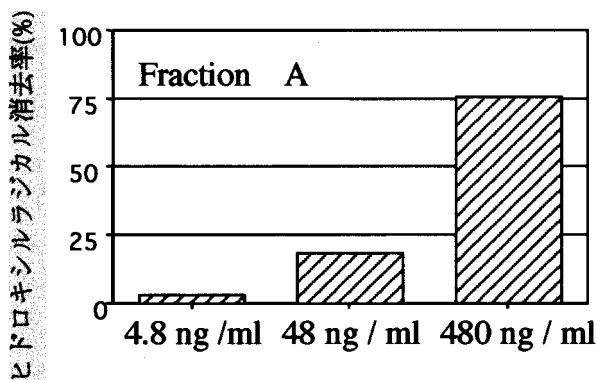


図6 分画Aのヒドロキシラジカル消去率 (%) の濃度依存性

4. まとめ

山椒果実から抗酸化物質を抽出し、その諸性質を調べた。linoleic acidの自動酸化による過酸化脂質蓄積抑制を指標とし、その評価をthiocyanate methodで行ったところ、山椒果実methanol extractは、 α -tocopherolと比較して、ほぼ同等の抗酸化能力を示した。methanol extractは中性から酸性域で、120 $^{\circ}$ Cの熱処理に対し安定であった。methanol extractを逆相液体クロマトグラフィーで分離・精製したところ、分

画Aを含む、少なくとも7つの分画が得られ、そのいずれも α -tocopherolと同等の抗酸化能力を示した。分画Aを試料とし、HO・消去能力をESRで測定したところ、480 ng/mlの低濃度で75%以上のHO・を消去した。

本研究の成果の一部について特許出願を行った(出願日:平成12年6月13日)。

5. 参考文献

- 1) Cutlar, R.G., *Free radicals in biology* (Academic press, Orlando), vol. 6, Chapter 11, (1984).
- 2) Cutlar, R.G., *Radicals and aging* (Birkhauser Verlag, Basel) p.31, (1992).
- 3) Zagi, K., *Chem. Phys. Lipids*, 45, 337 (1987).
- 4) 平原文子, 富岡和久, 大谷八峯, 石井兼二, ビタミン, 65, 165-172 (1994).
- 5) Katsuzaki, H., Kawakishi, S., And Osawa, T., *Phytochemistry*, 35, 773 (1994).
- 6) Miyake, Y., Yamamoto, K., and Osawa, T., Isolation of eriocitrin (Eriodictyol 7-rutinoside) from lemon fruit (*Citrus limon* Burm. F.) and its antioxidative activity. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, 3 84-89 (1997).
- 7) 奥田拓男, 高濱有明夫他, 活性酸素と医食同源, 205-209, 224-232 (1996).
- 8) Osawa, T. and Namiki, M., A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 735-739, (1981).
- 9) Mitsuda, H., Yamamoto, K. and Iwami, K., Antioxidative action of indole compounds during the autooxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo*, 19, 210-214 (1966).
- 10) Mitsuta, K., Mizuta, Y., Kohno, M., Hiramatsu, M., Mori, A., The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63, 187-191 (1990).
- 11) Das, K.C., Das, C.K., Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277 (2), 443-447 (2000).

- 12) N, Konagaya., M, Inagaki., S, Nishikawa., N, Kashimura., Facile reaction of gangliosides with hydroxyl radical. *Redox Report*. **2(3)**, 185 - 189 (1996).