

# 岐阜県内自生樹木の葉部抽出液における ポリフェノール含量と抗酸化活性

上辻久敏・中島美幸・坂井至通

岐阜県森林研究所研究報告 第36号 別刷

2007年3月

## 資料

# 岐阜県内自生樹木の葉部抽出液における ポリフェノール含量と抗酸化活性

上辻久敏・中島美幸・坂井至通

キーワード：ポリフェノール，抗酸化活性，樹木，葉部，アカメガシワ

## I はじめに

ポリフェノールは複数のフェノール基をもつ化合物を示し、シキミ酸合成経路などで生成した化合物のうち、ベンゼン環に複数の水酸基が結合した化合物の総称とされている。これらの化合物は、一般的に抗酸化活性を示すとともに、他にも多様な生理的機能を発揮する成分として注目されている。

活性酸素は、酸素に紫外線が照射されることや生体の呼吸、エネルギー代謝等により発生する。また、活性酸素は生命維持に必要であるが、過剰な活性酸素はDNAを破壊するなど悪影響を及ぼす。植物の活性酸素消費能力については、様々な研究がされており、活性酸素を捕捉する物質として、ビタミンC、ビタミンE、スーパーオキシドジスムターゼなどが知られている(中野, 1990; 並木, 1990)。植物は、その成長過程で生成する余分な活性酸素から組織を保護するために、ポリフェノール類も同時に生成しており、緑茶などに含まれるカテキン類や野菜、果実に存在するフラボン、フラボノール類、花や果実の色素であるアントシアニン類など様々な化学物質として存在している。いずれもポリフェノールのベンゼン環上にあるフェノール性水酸基の酸化還元電位が低いため、容易に酸化される。この性質がポリフェノールの抗酸化活性を示す一因となっている。

樹木の樹皮中には、フェノール性成分として、タンニン類、フラボノール類が含まれ、樹木を構成する重要な化学物質となっている(鮫島, 1981)。フェノール性成分は、樹皮に限らず樹木全体に分布するが、樹木の葉部利用についてはクワ、カキ、イチョウなど健康茶として利用される以外、あまり検討されていない。そこで、樹木の有効活用を図るため、岐阜県内に自生する15樹種の葉部と、比較対象として葉部を原材料

とする市販の健康茶について熱水およびエタノール抽出液に含まれるポリフェノール含有率とラジカル捕捉活性を測定した。

## II 方法

### 1. 試料

供試材料として、岐阜県内で採集した15樹種を用いた(表-1)。採集後、葉部は室内にて風乾した後、ミルサーで粉砕し試料とした。また、葉部を原材料として市販されている健康茶(粉末)15種(表-2)を供試材料とした。これら供試材料の乾重率は、約1gの粉末を熱風乾燥機で105℃、24時間乾燥した後の重量(乾重)から算出した。

### 2. 試薬および機器

#### 2. 1 試薬

フォリン-デニス試薬：10g タングステン酸ナトリウム、2g リンモリブデン酸、10ml リン酸を水に溶かして100ml に調整した。炭酸ナトリウムは、Wako社製を使用した。

DPPH 溶液：DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Wako社) 98.6mg をエタノールに溶かして100ml に調整した。

酢酸緩衝液 (pH 5.5)：酢酸ナトリウム三水和物 13.6g を水に溶かして約900ml にし、酢酸で pH 5.5 に調整後 1l に定容した。

標準物質のクロロゲン酸は、Wako社製を使用した。

#### 2. 2 機器

熱風乾燥機：ISUZU社製 SSR-115型、遠心分離機：TOMY社製 LC-122型、振とう抽出機：TAITEC社製 SR-2s型、マイクロプレートリーダー：大日本製薬社製

POWERSCAN HT 型、マイクロプレートは、可視領域用 96 穴 ICN バイオメディカル社製を用いた。濾紙はアドバンテック社 No. 2 を用いた。

### 3. 試験溶液の調製

#### 3. 1 熱水抽出液

各種試料約 1 g を 200 ml のフラスコに精秤し、水 50 ml を加え 100 °C にて 30 分間抽出した。抽出後、3500 r. p. m. で 15 分間遠心分離を行い、上清を濾過し、濾液を水で 50 ml に定容し熱水抽出液とした。

#### 3. 2 エタノール抽出液

各種試料約 1 g を 50 ml の遠沈管に精秤し、70% エタノール水溶液 20 ml を加え 300 r. p. m. で 40 分間振とうした。振とう抽出後、3500 r. p. m. で 15 分間遠心分離を行い、上清を濾過し、濾液を 70% エタノール水溶液で 20 ml に定容しエタノール抽出液とした。

### 4. ポリフェノールの定量

ポリフェノールの定量はフォリン-デニス法 (Appel, 2001) を用いた。各樹種の熱水抽出液および 70% エタノール抽出液 10  $\mu$ l を 96 穴マイクロプレート上にとり、100  $\mu$ l のフォリン-デニス試薬と攪拌した後、200  $\mu$ l の飽和炭酸ナトリウム水溶液を加えた。30 分放置後、760 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。ブランクにはフォリン-デニス試薬の代わりに水を用い、標準物質としてクロロゲン酸を用いた。

### 5. ラジカル捕捉活性の測定

ラジカル捕捉活性は、DPPH によるラジカル捕捉能

を分光学的に分析した。マイクロプレート上に、2.5 mM DPPH 溶液 50  $\mu$ l、100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を 100  $\mu$ l とし、次にそれぞれの抽出液で 10 倍に希釈した熱水およびエタノール抽出液各 10  $\mu$ l ずつに 70% エタノール 90  $\mu$ l を加え、全量を 250  $\mu$ l とした。試料添加後、暗所にて 20 分放置し、517 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。コントロールの測定値は、試料の代わりに 70% エタノール水溶液を用いた。なお、ラジカル捕捉活性は各吸光度を用いて次式により算出した。

ラジカル捕捉活性 = ((コントロールの測定値 - 試料の測定値) / コントロールの測定値)  $\times$  100

## III 結果

### 1. 各樹種の葉部におけるポリフェノール含有率

熱水抽出物におけるポリフェノール含有率を、フォリン-デニス法を用いて測定した結果、市販の健康茶において、ユーカリ茶、緑茶、紅茶 A および紅茶 B のポリフェノール含有率は、それぞれ 12.6, 11.4, 12.4, 11.6% であった。その他の市販品では、グアバ茶、甜茶およびバナバ茶には、10.1, 8.8, 8.1% のポリフェノール含有率を示した。市販のクコ茶、センナ茶、メグスリノキ茶では、ポリフェノール含有率は 2% 未満であった。自生樹木の葉部では、アカメガシワにおいてポリフェノール含有率が最も高く、乾燥重量当たり 17.4% であった。アカメガシワ葉部のポリフェノール含有率は、緑茶におけるポリフェノール含有率 11.4% を上回る結果であった。次に、タカノツメ、ア

表 - 1 供試自生樹種一覧

樹種	学名	科名
アケビ	<i>Akebia quinata</i>	アケビ科
コシアブラ	<i>Acanthopanax sciadophylloides</i>	
ヤマウコギ	<i>A. spinosus</i>	ウコギ科
タカノツメ	<i>Evodiopanax innovans</i>	
シロモジ	<i>Lindera triloba</i>	クスノキ科
クロモジ	<i>L. umbellata</i>	
クサギ	<i>Clerodendrum trichotomum</i>	クマツヅラ科
アカメガシワ	<i>Mallotus japonicus</i>	トウダイグサ科
サルナシ	<i>Actinidia arguta</i>	
マタタビ	<i>A. polygama</i>	マタタビ科
ホオノキ	<i>Magnolia obovata</i>	
タムシバ	<i>M. salicifolia</i>	モクレン科
コブシ	<i>M. kobus</i>	
アマチャ	<i>Hydrangea setata</i> var. <i>thunbergii</i>	ユキノシタ科
リョウブ	<i>Clethra barvinervis</i>	リョウブ科

表-2 供試市販品一覧

商品名	原料種名	学名	科名
メグスリノキ茶	メグスリノキ	<i>Acer nikoense</i>	カエデ科
ギムネマシルベスタ茶	ギムネマシルベスタ	<i>Gymnema sylvestre</i>	ガガイモ科
カキ葉茶	カキノキ	<i>Diospyros kaki</i>	カキノキ科
羅布麻茶	ラフマ	<i>Apocynum venetum</i>	キョウチクトウ科
クワの葉茶	クワ	<i>Morus lhou</i>	クワ科
緑茶	チャノキ	<i>Camellia sinensis</i>	ツバキ科
紅茶A	チャノキ	<i>Camellia sinensis</i>	ツバキ科
紅茶B	チャノキ	<i>Camellia sinensis</i>	ツバキ科
クコ葉茶	クコ	<i>Lycium chinense</i>	ナス科
甜茶	テンチャ	<i>Rubus swavissmus</i>	バラ科
グアバ茶	バンザクロ	<i>Psidium guajava</i>	フトモモ科
ユーカリ茶	ユーカリノキ	<i>Eucalyptus globulus</i>	フトモモ科
センナ茶	センナ	<i>Cassia angustifolia</i>	マメ科
ルイボスティー	ルイボス	<i>Aspalathus linearis</i>	マメ科
バナバ茶	オオバサルスベリ	<i>Largerstroemia speciosa</i>	ミソハギ科

マチャおよびアケビの各葉部において7.2%, 6.1%, 5.7%のポリフェノールが含まれていることが認められた(図-1)。その他、コシアブラ、マタタビ、クサギおよびホオノキの各葉部では、含量が少なく2%未満であった。

次に70%エタノール抽出液におけるポリフェノール含有率を測定した結果、市販品において、緑茶から抽出されたポリフェノール含量が最も高く、乾燥重量当たり16.8%であった。次に、紅茶A、紅茶Bのポリフェノール含量が高く、それぞれ、10.8、10.0%であった。その他、グアバ茶、ユーカリ茶では、5.8、6.5%であった。市販のギムネマシルベスタ茶、クコ茶、クワ茶、カキ茶、センナ茶およびメグスリノキ茶では、ポリフェノール含量が低く2%以下であった。自生樹木では、アカメガシワ葉部抽出液のポリフェノール量が最も高く、乾燥重量当たり14.3%であった。その他、タカノツメ、リョウブ、アマチャおよびアケビの各葉部において、それぞれ6.4、5.1、4.6、4.1%のポリフェノールが含まれていた。本研究で、ポリフェノール含有量の測定に用いたフォリン-デニス法は、フェノール性水酸基との反応を利用して発色させ吸光分析する。しかし、反応性は化学構造により大きく異なり、かつ、試料に含まれる全ポリフェノールの含有率をクロロゲン酸濃度として換算して求めている。また、フォリン-デニス法では、ポリフェノール以外の物質が、検出反応に影響する可能性がある。しかし、現状では、ポリフェノール含有量を正確に測る簡易測定法は存在していない。

本研究で得られた緑茶や紅茶の結果は、過去に報告されている緑茶や紅茶のポリフェノール含有量(三輪, 1978)とほぼ同じ値であった。樹木の葉部に存在する成分をスクリーニングする目的としては、有効な方法である。

## 2. 各樹種の葉部抽出液における DPPH ラジカル捕捉活性

フェノール性化合物であるポリフェノールは、ベンゼン環に結合した水酸基によりラジカルを捕捉することから、抗酸化物質としての機能が注目されている。そこで、熱水抽出液におけるラジカル捕捉活性を測定した結果、市販の健康茶では、緑茶、ユーカリ茶、紅茶A、紅茶Bおよびグアバ茶において捕捉活性が高く、それぞれ31.3から24.3%のラジカル捕捉活性を示した(図-2)。その他の市販品においてもラジカル捕捉活性が認められた。ギムネマシルベスタ茶、センナ茶、クコ葉茶およびメグスリノキ茶では、捕捉活性は10%未満であった。試験に供した自生樹木では、アカメガシワとコブシの各葉部においてラジカル捕捉活性が高く、それぞれ33.5、25.0%であった。一方、コシアブラ、マタタビおよびクサギの各葉部では、ラジカル捕捉活性が低く5%未満であった。その他の自生樹種の葉部では、10から15%のラジカル捕捉活性を有していることが認められた。

70%エタノール抽出液におけるラジカル捕捉活性を測定した結果、市販の健康茶では、熱水抽出の場合と同じく、緑茶、ユーカリ茶、紅茶A、紅茶Bおよびグアバ茶において高いラジカル捕捉活性を示した。緑茶、紅茶Aおよび紅茶Bのラジカル捕捉活性は、それぞれ、67.8、54.8、44.2%であった。その他、ユーカリ茶、グアバ茶には、37.8、31.8%のラジカル捕捉活性が認められた。クコ葉茶、メグスリノキ茶およびクコ葉茶のラジカル捕捉活性は低く、それぞれ、1.7、3.3、4.0%であった。試験に供した自生樹木では、アカメガシワ葉部におけるラジカル捕捉活性が最も高く、61.1%であった。その他、タカノツメ、タムシバおよび

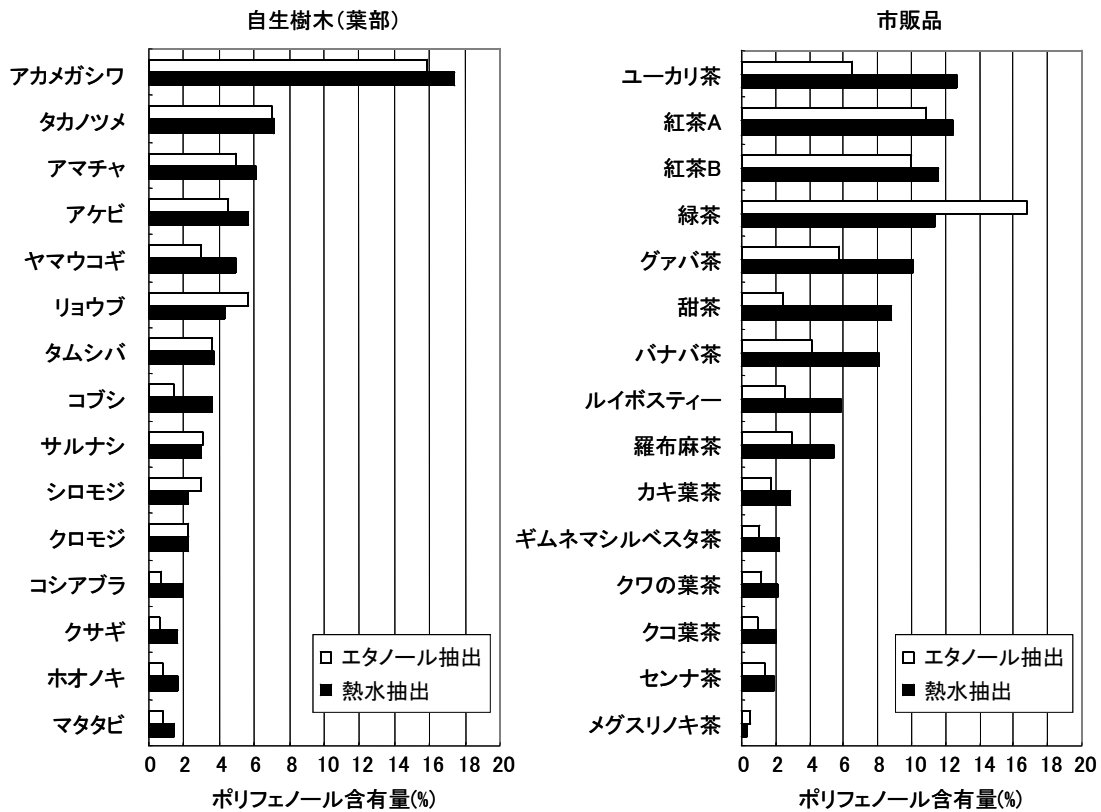


図-1 自生樹木と市販品抽出液におけるポリフェノール含有率

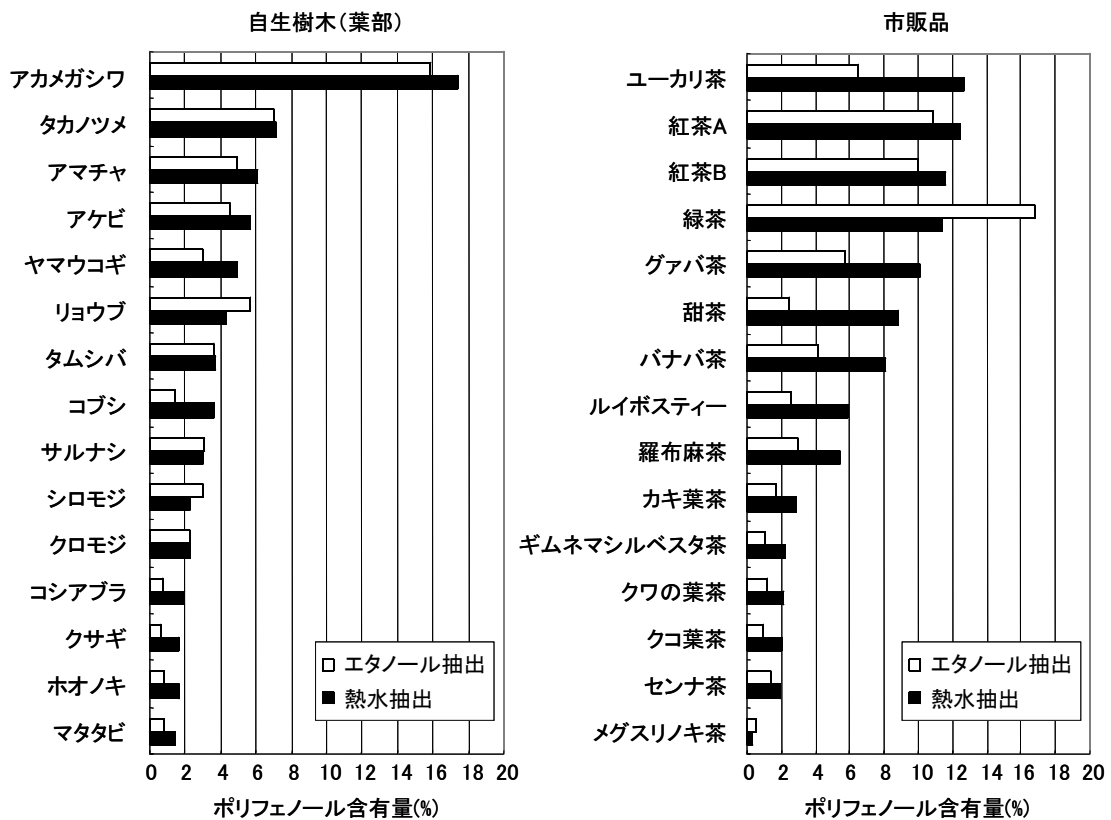


図-2 自生樹木と市販品抽出液におけるラジカル捕捉活性

リョウブの各葉部において、37.3, 35.3, 30.6% の捕捉活性が認められた。マタタビとクサギの各葉部抽出液からは、わずかなラジカル捕捉活性しか検出されず1%以下であった。

### 3. ポリフェノール含有率とラジカル捕捉活性の関係

15種の自生樹木から採集した葉部と市販の健康茶15種におけるポリフェノール含有率に対するDPPHラジカル捕捉活性についてプロットした結果を示した(図-3)。熱水抽出とエタノール抽出試料共に、ポリフェノール含有率が、増加するにともないラジカル捕捉活性も高まる傾向を示した(熱水抽出市販品  $R^2=0.95$ , 熱水抽出自生樹木  $R^2=0.70$ ; エタノール抽出市販品  $R^2=0.96$ , エタノール抽出自生樹木  $R^2=0.82$ )。今回の試料の中で、緑茶とアカメガシワ葉部のポリフェノール含有率が高く、共に高いラジカル捕捉活性をしめした。緑茶, 紅茶A, 紅茶B, アカメガシワ, タカノツメおよびリョウブの各葉部のポリフェノール含有率に対するラジカル捕捉活性が、熱水よりもエタノール抽出液において高く、その他の試料においても同じ傾向を示す試料が多く認められた。

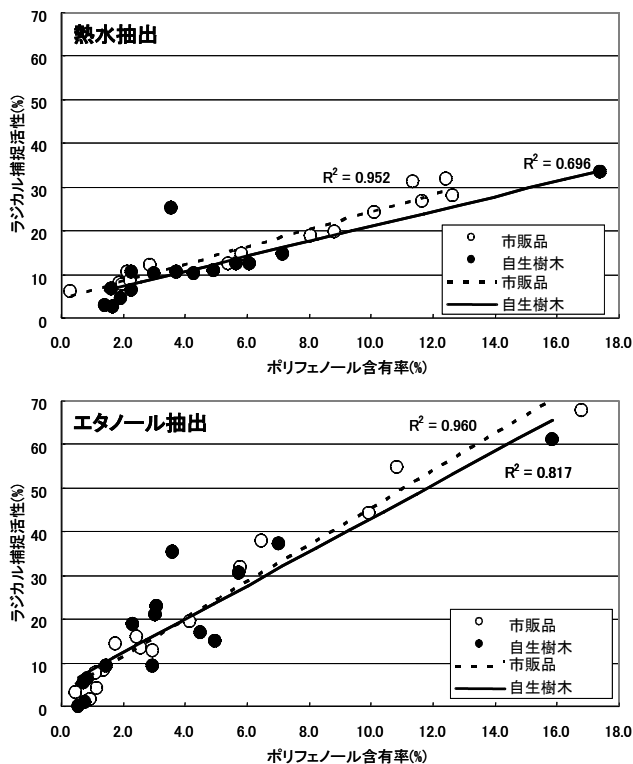


図-3 ポリフェノール含有率とラジカル捕捉活性の関係

## IV 考察

各種植物成分による生体への多様な作用が広く注目されており、抗酸化作用については、日本茶について多数報告されている(井上, 1997)。その抗酸化活性は、カテキン類の寄与が大きいと考えられている(棟久, 1999)。

今回、岐阜県内で採集した15種の自生樹木の葉部と、比較対象として葉部を原材料とする市販の健康茶における熱水とエタノール抽出液に含まれるポリフェノール含有率を測定した。緑茶, 紅茶Aおよび紅茶Bにおける熱水抽出のポリフェノール含有率は、ともに近い値を示した(図-1)。この結果は、緑茶と紅茶が同じチャノキであるためポリフェノール含有率にほとんど差がないことや緑茶と紅茶の製法過程における発酵の違いなどがポリフェノール含有率に影響しない可能性を示している。ほうじ茶では、茶葉を焙焼して製造されるがこの行程においてカテキン類が変化することが知られている(井上, 1997)。また、製造工程だけでなく、クロモジ, ヤマモモおよびアカメガシワ葉部における抗酸化活性が、採集時期により変動することが報告されている(島根農研報, 2003)。自生樹木の葉部の利用に関して、採取時期や加工などの処理によるポリフェノール含有率の変化と抗酸化活性の変動については、今後検討が必要であると考えられる。

これまでに日本茶のDPPHラジカル捕捉活性に関する研究結果から、煎茶や玉露では30倍希釈、ほうじ茶では、20倍希釈しても活性が認められている。熱水抽出した煎茶, 玉露およびほうじ茶には、それぞれ4.1, 3.2, 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度でカテキン類が含まれていた(棟久, 1999)。カテキン類は、日本茶が抗酸化活性を示す主要な要因と考えられている。

熱水抽出した試料においてアカメガシワの葉部は緑茶を上回るポリフェノール含量を示した。これまでに、アカメガシワ樹皮には、ベルゲニンおよびその誘導体(Yoshida, 1982)、多数のタンニン類などが単離され、アカメガシワの葉部には、ルチン、数種のタンニン類(Saijo, 1989; Okuda, 1978)などの抗酸化物質の存在が報告されている。本研究におけるDPPHを用いたアカメガシワのラジカル捕捉活性から、緑茶に存在するカテキン類のラジカル捕捉能に匹敵するラジカル捕捉物質が存在する可能性が示された。

ポリフェノールが含まれる食品には、様々なものがあり、国民生活センターでは、ココア(1050~3450  $\text{mg}/100\text{g}$ )、チョコレート(850~1800  $\text{mg}/100\text{g}$ )、赤ワイン(250~450  $\text{mg}/100\text{ml}$ )などポリフェノール含有食品のリストが公表されており、ポリフェノール含

有食品のもつ新たな機能性が期待されている。本研究において、アカメガシワ葉部の熱水およびエタノール抽出液には、高濃度のポリフェノールが含まれており、健康茶として利用開発できる素材として有望と思われる。

#### 参考文献

- 中野実・浅田浩二・大柳善彦（1990）活性酸素-生物での生成・消去・作用の分子機構-共立出版 536pp
- 並木三夫・松下雪朗（1990）食品の品質と成分間反応 講談社 278pp.
- 鮫島正浩・善本知孝（1981）針葉樹樹皮のフェノール性抽出成分の特徴について. 木材学会誌 27 : 491-497.
- 井上知明・大藤升美・小松正幹（1997）日本茶及び「健康茶」浸出液の抗酸化作用について. 京都府保環研年報 42 : 7-10.
- 棟久美佐子・井上知明・小松正幹（1999）日本茶及び「健康茶」浸出液の抗酸化作用について(II). 京都府保環研年報 44 : 20-25.
- 三輪悦夫・高柳博次・中川致之（1978）葉位別にみた茶葉の化学成分含量. 茶研報 47: 48-52.
- Appel HM., Govenor HL., D'Ascenzo M., Siska E., Schultz JC(2001) Limitations Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. J. Chem. Ecol. 27:761-778.
- Yoshida T., Seno K., Takama Y., Okuda T. (1982) BERGENIN DERIVATIVES FROM MALLOTUS JAPONICUS. Phytochemistry 21:1180-1182.
- Saijo R., Nonaka G., Nishioka I. (1989) PHENOLGLUCOSIDE GALLATES FROM MALLOTUS JAPONICUS. Phytochemistry 28:2443-2446.
- Okuda T., Seno K. (1978) MALLOTUSNIC ACID AND MALLOTINIC ACID, NEW HYDROLYZABLE TANNINS FROM MALLOTUS JAPONICUS, Tetrahedron Lett., 2: 139-142.
- Saijo R., Nonaka G., Nishioka I. (1989), Tannins and related compounds. LXXXIV. Isolation and characterization of five new hydrolyzable tannins from the bark of Mallotus japonicus. Chem. Pharm. Bull., 37:2063-2070.