報 文

植物性食品の抗酸化能及びアボカド果皮の抗酸化性物質

能 勢 征 子*・藤 野 直 子**

Antioxidant Activities of Some Vegetable Foods and Active
Component of Avocado Epicarp

Masako Nose* and Naoko Fujino**

* Tachikawa College of Tokyo, Azuma-cho, Akishima-shi, Tokyo, 196

** Central Research Laboratory, Sankyo Co. Ltd., Hiro-machi, Shinagawa-ku, Tokyo, 140

Antioxidant activities in the methanol soluble fraction of the rind and the content of 12 kinds of fruits, 37 vegetables and 7 others, were examined by the inhibitory effect on the formation of the peroxide from methyl linolate in the test tube at 50°C. Among these samples the epicarp of avocado showed the strong antioxidant activity. It corresponds to about one third of the activity of green tea, rosemary or sage which are already reported with their strong antioxidant activities. Besides, the activity was observed in the followings: a flower of the butter bur, yellow and out layer of onion, red pepper and dried laver. The main antioxidant component in the epicarp of avocado was isolated in the eluate with CHCl_3 -ethylacetate (1:1) by silica gel column chromatography after the extraction with methanol, water and then ethylacetate, and it was determined to be *l*-epicatechin on thin layer and paper chromatographies.

(Received Jan. 9, 1982)

食用油脂の酸化変性防止のために古くから植物成分より酸化防止剤の検索が行われ、小麦や米の胚芽からの α -トコフェロール、クレオソートブッシュの葉や幹からのノルジヒドログアヤレチック酸、ユソウ木の心材からのグアヤク脂等、実用に供されているものも多い¹⁾。香辛料の中でも抗酸化成分が知られ、香草系香辛料に属するローズマリー、セージ等が特に強い抗酸化効果を持つ事は多くの研究者によって確められている²⁾。

著者らは、これら抗酸化成分が、それ自身の植物体中ではたす役割を考え、その存在部位との関連性に興味を持ち、従来食用に供されている部分のみならず、外皮部分にも着目して植物食品中の抗酸化物質の検索を行った。続いて抗酸化効果が強くみられたアボカド果皮中に存在する抗酸化成分を分離し、*l*-エピカテキンと推定される結果を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

1. 試料

果実類：レモン、ライム、温州みかん、グレープフルーツ、かき、もも、パイナップル、バナナ、りんご、パイヤ、キウイフルーツ、アボカド、

野菜類：かぼちゃ、青じそ、赤とうがらし、にら、にんじん、ピーマン、ほうれん草、みつば、うど、キャベツ、きゅうり、ごぼう、さやいんげん、しょうが、だいこん、たまねぎ、なす、にんにく、ねぎ、はくさい、カリフラワー、ふき、ふきのとう、もやし、れんこん、しいたけ、

豆類穀類その他：小豆、大豆、玄米、粟、はと麦、わかめ、のり、緑茶、ローズマリー、セージ、ナタネ、エゴマ、ヒマワリ種子、

* 東京都立川短期大学 (〒196 東京都昭島市東町 3-6-33)

** 三共株式会社中央研究所 (〒140 東京都品川区広町 1-2-58)

以上はすべて市販品を用いた。

2. 試料抽出液の調製法

上記食品について外皮と内側部分を別に出来るものは分離後、細切りし、5 g とり乳鉢でよくすりつぶし、メタノール 20 ml を加え 1 晩 5°C で抽出したものを試料抽出液とした。豆類穀類その他の食品については、ブレンダーで粉碎し、その 5 g にメタノール 20 ml を加え同様に試料抽出液とした。

3. 抗酸化効果測定法

基質として、東京化成(株)の試薬リノール酸メチル(POV: 16 meq/kg)を用い、過酸化値(POV)測定は常法⁹⁾ 通り行った。

すなわち、リノール酸メチル 100 μ l と試料抽出液 50 μ l を内径 1.6 cm 高さ 10 cm の試験管に入れ、50°C の恒温水槽で 18~22 時間酸化させる。この反応条件は、少量の試薬、試料を用い短時間で多くの検体処理を目的としたものである。クロロホルム酢酸混合液(2:3) 35 ml にて溶解し 300 ml 容共栓付三角フラスコに移す。窒素ガスでフラスコ病空気を置換後、ヨウ化カリウム飽和水溶液 1 ml 添加、1 分間激しく混合、暗所で 5 分間放置し生成している過酸化値により $I^- \rightarrow I_2$ に変化させる。ただちに蒸留水 75 ml、デンプン試薬 1 ml 添加混合後、0.1 N 又は 0.02 N チオ硫酸ナトリウム溶液で I_2 の逆滴定を行い POV を算出した。なお、この方法により生成し

Fig. 1 Time Course of Peroxides Formation by Methyl Linolate Auto-oxidized at 50°C

Reaction mixture contains 100 μ l of methyl linolate and 50 μ l of methanol in test tube.

Fig. 2 Inhibitory Effect by *d*-Catechin on the Formation of Peroxides after 21 hour Oxidation

POVs: Peroxide value with the sample (*d*-catechin), POV_c: Peroxide value without the sample (control). This inhibition curve was used for the calculation of the antioxidant activities of the samples in Table 1-3.

た POV の経時的な変化は Fig. 1 であり、反応時間が 10 時間から 32 時間の間であれば POV は直線的に増加する事が認められる。

そこで、この方法により既知の抗酸化性物質 *d*-カテキンによる POV 生成阻害効果を観察した結果が Fig. 2 である。横軸に反応液中の *d*-カテキンの濃度を、縦軸に対照液に対する *d*-カテキン添加液の POV 生成比をプロットした。 α -トコフェロールについても同様な阻害曲線が得られたので、この方法は抗酸化効果測定法として適当であると判断した。すなわち、各試料の抗酸化効果の相互比較を容易にするために簡単な数値で表わすことを目的として、Fig. 2 を検量線として使用し抗酸化活性をカテキン換算値として算出した。具体的方法は、試料抽出液をメタノールで段階的に希釈しこれら希釈液を添加した各反応液及び対照液の POV を測定 (POV_s 及び POV_c) し、POV_s/POV_c を求めこの数値を Fig. 2 の阻害曲線に挿入、概当するカテキン濃度を読み、それに反応液量 150 μ l 及び希釈倍率を乗じ試料 1 mg あたりのカテキン量 (m μ mole) に換算した値を算出; これを抗酸化活性を表示する数値とした。

4. アボカド果皮の抗酸化成分の単離及び同定方法

(1) 試料からの溶媒抽出

アボカド完熟果皮 7 g を細切りし、乳鉢で磨砕、メタ

ノール 40 ml で 5°C 1 晩抽出する。この抽出液をロータリーエバポーターにて 30°C 減圧下で濃縮しメタノールを除去する。水 40 ml を加えよく混和後、遠心分離 (3,500 rpm, 15 分) にて水不溶物を除く。クロロホルム 40 ml を添加混合しクロロホルム可溶性区分を除いた後、酢酸エチル 40 ml を添加混合して酢酸エチル層に転溶させる。この操作を 2 回くり返し無水硫酸ナトリウムで脱水後、酢酸エチル層を濃縮し約 1 ml とした。

(2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲル (ワコーゲル C-100, 和光純薬工業 (株) 製) 3 g を *n*-ヘキサンに懸濁膨潤させ、内径 0.6 cm 高さ 14 cm に充填したカラムを使用した。

酢酸エチル濃縮液 0.5 ml を吸着させ、*n*-ヘキサン、クロロホルム、クロロホルム酢酸エチル混合液①8:1, ②4:1, ③2:1, ④1:1, ⑤1:2 各 50 ml で順次溶出、分取後減圧下で濃縮、約 1.5 ml とした。

(3) シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) 及び二次元ペーパークロマトグラフィー⁴⁾⁻⁶⁾

薄層プレートは、Kieselgel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, Merck 社製, を使用し展開溶媒は下記の系統を中心に用いた。

① 酢酸エチル-クロロホルム-ギ酸-水 (8:1:1:1)

② トルエン-酢酸エチル-ギ酸 (5:4:1)

濾紙は東洋濾紙 No. 50 を使用, 展開溶媒は一次元: 2%酢酸, 二次元: *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2.2) を用いた。

クロマトグラム上の検出方法⁴⁾は、まづ紫外線下観察を行った後、次の発色反応によった。一般的なものとしてはヨード蒸気中における発色、ポリフェノール検出用にはフェリシアンカリ-塩化第二鉄溶液 (各 15 mg を 5 ml の水に溶解, 両液を混合したもの) で青色に、カテキン類の検出用にはバニリン塩酸試薬 (1%バニリンエタノール溶液 5 ml と濃塩酸 3 ml を使用直前に混合) で紅赤色に呈色する。

(4) 旋光度の測定

Perkin-Elmer Polarimeter 241-MC にて $[\alpha]_D^{20}$ の測定を行った。

実験結果及び考察

1. 各種植物性食品の抗酸化能

Table 1~3 に抗酸化効果について得られた結果をまとめた。なお、抗酸化効果の強いものについては、その抗酸化活性をカテキン換算値 ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ 試料) として表示した。

強い抗酸化能のみられたものは、従来の報告通りセー

ジ、緑茶、ローズマリーであった。アボカド果皮がそれに続き、その活性は上記 3 試料の約 1/3 に相当する。しかしながら、これは上記試料が乾燥品でありアボカド果皮がそうでない事を考慮せず一律に重量あたりの値として比較したためで水分含量を補正すれば、アボカド果皮の抗酸化能はもう少し高くなると思われる。ふきのとう、玉ねぎの外皮、赤唐辛子、海苔にも抗酸化能が認められたが、今回はメタノール抽出成分についてのみの検討であり他の溶媒による検討は行っていない。

さて、外皮部分がその内側の食品成分の酸化防止の役割をになっているのではないかと仮定して外皮部分の抗酸化活性を調べたのであるが、かなり強い抗酸化能を認める事が出来たのはアボカド果皮のみであった。アボカド果実は、脂質含量が他のものに比べ非常に高く、その外皮に抗酸化成分が存在するということは、当初の仮定にあてはまる一例と思われる。そこで、このアボカド果皮中の抗酸化成分を追求した。

Table 1 Antioxidant activities of the rind and the content of some fruits

Sample	(mg)	*POVs/**POVc (meq/kg)	***activity ($\mu\text{mole}/\text{mg}$)
apple	R 12.5	1504/1826	
avocado	R 0.25	107/1772	53
	C 12.5	1665/1772	
banana	R 12.5	750/1772	
	C 12.5	1570/1772	
grapefruit	R 12.5	1396/1825	
	C 12.5	1290/1638	
kiwifruit	R 12.5	1880/1772	
	C 12.5	1400/1772	
lemon	R 12.5	1342/1772	
	C 12.5	1560/1638	
lime	R 12.5	1396/1772	
	C 12.5	1500/1638	
peach	R 12.5	560/1772	
persimon	R 12.5	665/1825	
papaya	R 12.5	1235/1825	
	C 12.5	1665/1825	
pineapple	R 12.5	1074/1772	
	C 12.5	1557/1772	
Unshu orange	R 12.5	1440/1966	

*POVs: Peroxide value with the sample; **POVc: Peroxide value without the sample (control); ***Activity: Antioxidant activity was expressed as the concentration of *d*-catechin per mg of the sample ($\mu\text{mole}/\text{mg}$), which are calculated from the inhibitory curve by the standard *d*-catechin on the oxidation of methyl linolate. 'R': the rind of the sample; 'C': the content of the sample.

Table 2 Antioxidant activities of the whole, the rind and the content of some vegetables

Sample	(mg)	*POVs/**POVc (meq/kg)	***Activity (m μ mole/mg)
a flower of the butter bur (fukinotou)	W 12.5	75/1773	1.1
aralia cordata (udo)	R 12.5	1612/1826	
arrow head (kuwai)	R 12.5	1074/1397	
bean sprout (moyashi)	W 12.5	1182/1397	
buckwheat (sobako)	W 12.5	1343/1966	
cabagge	W 12.5	1418/1826	
carrot	R 12.5	1289/1773	
cauliflower	W 12.5	1612/1826	
Chinese cabagge (hakusai)	W 12.5	1558/1826	
Chinese yam (yamatoimo)	R 12.5	1021/1740	
coltsfoot (fuki)	W 12.5	860/1826	
Cortinellus shiitake (shiitake)	W 5.6	1364/1988	
Cryptotaenia japonica (mitsuba)	W 12.5	1236/1397	
cucumber	R 12.5	1021/1397	
egg plant	R 12.5	1450/1826	
fox-tail (awa)	W 12.5	1225/1483	
garlic	R 5.6	1397/1773	
ginger	R 12.5	516/1826	
great burdock (gobo)	R 12.5	1397/1826	
green pepper	W 12.5	913/1397	
job's tear (hatomugi)	W 12.5	1289/1483	
leek (nira)	W 12.5	1128/1826	
lotus root (renkon)	R 12.5	1128/1397	
okura	W 12.5	1397/1826	
onion	R 3.75	107/1826	3.6
parsley	W 12.5	1021/1773	
perilla (aojiso)	W 8.5	430/1826	
potato	R 12.5	645/1740	
pumpkin	R 12.5	408/1773	
red pepper	R 5.0	376/1966	1.3
small red bean (azuki)	W 5.0	999/1988	
spinach	W 12.5	1440/1826	
soy bean	W 12.5	1136/1966	
seed of sunflower (himawarinotane)	W 12.5	967/1483	
sweet potato	R 12.5	720/1740	
taro (satoimo)	R 12.5	1289/1740	
unpolished rice (genmai)	W 12.5	645/1773	

*POVs: Peroxide value with the sample; **POVc: Peroxide value without the sample (control); ***Activity: Antioxidant activity was expressed as the concentration of *d*-catechin per mg of the sample (m μ mole/mg), which are calculated from the inhibitory curve by the standard *d*-catechin on the oxidation of methyl linolate.
'W': the whole of the sample; 'R': the rind of the sample.

Table 3 Antioxidant activities of other foods

Sample	(mg)	*POVs/**POVc (meq/kg)	***Activity (m μ mole/mg)
dried cuttlefish (surume)	12.5	1558/1966	
dried laver (norj)	0.36	1751/1966	2.5
green tea	0.11	75/1966	136
rape (natane)	12.5	269/1483	
rosemary	0.11	86/1740	127
sage	0.11	64/1826	138
wakame seaweed	5.6	1912/1988	

*POVs: Peroxide value with the sample; **POVc: Peroxide value without the sample; ***Activity: Antioxidant activity was expressed as the concentration of *d*-catechin, which are calculated from the inhibitory curve by the standard *d*-catechin on the oxidation of methyl linolate.

2. アボカド果皮より抗酸化成分の単離並びに同定

アボカド果皮のメタノール抽出液を濃縮，水を加えて水溶性区分をとる。クロロホルムで洗浄後，酢酸エチルに転溶させ，酢酸エチル層を濃縮し，シリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけた。*n*-ヘキサン，クロロホルム，クロロホルム酢酸エチル混合液①8:1，②4:1，③2:1，④1:1，⑤1:2，酢酸エチルで順次溶出させ，各溶出区分を濃縮し，抗酸化活性を測定した結果が Table 4 である。クロロホルム酢酸エチル (1:1) 溶出区分に抗酸化活性が存在する。又，各溶出区分濃縮液を TLC にうち，溶媒①で展開後ヨード蒸気中で発色させたとこ，同じくクロロホルム酢酸エチル (1:1) 溶出区分に

Table 4 Antioxidant activities during the isolation procedures of the active component from the avocado epicarp

Procedure	*Total activity (μ mole)
I. Extraction	
1. extract with methanol	168
2. extract with H ₂ O	143
3. extract with ethylacetate	180
II. Silica gel column chromatography	
1. eluate with n-hexane	0
2. eluate with chloroform	0
3. eluate with CHCl ₃ : ethylacetate (8:1)	0
4. eluate with CHCl ₃ : ethylacetate (4:1)	0
5. eluate with CHCl ₃ : ethylacetate (2:1)	14.2
6. eluate with CHCl ₃ : ethylacetate (1:1)	168.0
7. eluate with CHCl ₃ : ethylacetate (1:2)	15.2
8. eluate with ethylacetate	18.6

* Total activity was expressed as the amount of *d*-catechin which are obtained from the same method described in Table 1.

Rf 0.86 の単一スポットが強く、次のクロロホルム酢酸エチル (1:2) 溶出区分にも同一 Rf のスポットが薄く観察された。他の溶出区分には、いずれもスポットが表れなかった。そこで、このクロロホルム酢酸エチル (1:1) 溶出区分濃縮液について溶媒を変えた TLC を行い、単一スポットであることを確かめ、さらに蛍光を發せず、フェリシアンカリ塩化第二鉄溶液で青色を呈し、バニリン塩酸試薬で紅赤色を呈する事を観察したので、カテキン類であろうと推定した。

Fig. 3 Thin Layer Chromatograms of the Isolated Sample (S), *d*-Catechin (C) and the Ethylacetate Fraction from Avocado Epicarp

Solvent A: ethylacetate. Solvent B: ethylacetate-chloroform-formic acid H_2O (8:1:1:1).

カテキン類には、構造上 B 環につく水酸基の数によってアフラゼキニン、カテキン、ガロカテキンの 3 種類あるが、果実野菜類ではカテキンが一般的でガロカテキンは少なく、アフラゼキンはほとんどないとされている。そこで *d*-カテキンを標準品として TLC 上で比較した。Fig. 3 にそのうちの 2 例を示した。酢酸エチルで展開するとテーリングし良い状態とは云えないが、*d*-カテキンではなさそうである。他の溶媒系でも、両者の Rf は非常に接近してはいるものの完全に一致しなかった。

カテキン類には 4 個の光学異性体が存在し、カテキンとそのエビマーはブタノール系溶媒で、*d* と *l* は酢酸水で分離されるはずである。単離成分と *d*-カテキンの 2 次元ペーパークロマトグラフィーを行い、両者を分離したのが Fig. 4 である。ブタノール系での Rf は *d*-カテキン 0.72, 単離成分 0.63, 2% 酢酸では *d*-カテキン 0.49, 単離成分 0.41 と完全に分離した。しかも文献値⁴⁾は、ブタノール系で *d*-カテキン 0.7, エピカテキン 0.6,

Fig. 4 Paper Chromatogram of *d*-Catechin and the Isolated Substance from the Avocado Epicarp

S: the isolated substance from the avocado epicarp.

ガロカテキン 0.52 である事より、このアボカド果皮から単離した抗酸化成分はエピカテキンと考えられる。なお、*l* と *d* に関しては、*d*-カテキンとの相互位置関係を文献⁴⁾に照合してみると *l*-エピカテキンであろうと思われる。

そこでカラムクロマトグラフィーで分離した活性区分つまりクロロホルム酢酸エチル (1:1) 溶出区分について旋光度の測定を行った。この溶出区分は、TLC で単一スポットであることを確認 (Fig. 3) しているものの、結晶させたわけではないので多少の不純物の混入が予想された。結果は $[\alpha]_D^{20} -45^\circ$ (50% アセトン) であり、文献値⁴⁾は *l*-エピカテキン $[\alpha]_D -60^\circ$ (50% アセトン)、*l*-カテキン $[\alpha]_D -16.8^\circ$ (50% アセトン) である。従って、この単離区分は光学活性純度から 75% の *l*-エピカテキンを含む事が結論された。

タンニン成分の果実中での存在は、桃、あんず等イバラ科果樹果実について報告が多く、*d*-カテキンは桃、あんず、すももの未熟果に、*l*-エピカテキンはマルメロ、梨、りんごの未熟果に多く含まれると云われ、アボカド果実中での存在も予想される⁷⁾⁻⁹⁾。なお、アボカド果皮メタノール抽出物中のタンニン定量をレーベンタール法¹⁰⁾、Folin-Denis 法¹¹⁾、バニリン硫酸法¹²⁾、ジアゾ法¹³⁾などにより試みた結果、完熟果皮にはカテキン含有量が多く、未熟果皮にはクロロゲン酸含有量が多いとの結果を得た。この事は、クロロゲン酸の抗酸化効果がカテキンの約 1/10 であること (本実験の抗酸化能測定方法による結果) を考えると、完熟果皮の抗酸化能が高い事と合致する。アボカド果皮の抗酸化能がすべて *l*-エピカテキンによると仮定して抗酸化能より *l*-エピカテキン

ン含有量を計算すると、アボカド果皮 1g あたり約 10 mg, すなわち 1% となり、これはカテキンの定量法であるバニリン硫酸法で得た値とほぼ一致した。

さらに、アボカドの果皮のみならず果実のタンニン成分についても熟度との関連性において追求する予定である。

要 約

天然に存在する抗酸化成分のその植物体内での存在部位に興味を持ち、今回特に植物性食品の外皮部分を取上げ、メタノール抽出液について抗酸化能を調べた。測定方法は、試験管内にてリノール酸メチル 100 μ l にメタノール抽出液 50 μ l を加え 50°C, 16~22 時間自動酸化させて生成する POV を測定する事によった。その結果、外皮に強い抗酸化能を観察できたのはアボカド果皮一例のみであった。この抗酸化能は、ローズマリー、セージ、緑茶の抗酸化能の 1/3~1/2 程度と思われる。このアボカド果皮中の主たる抗酸化成分は、カラムクロマトで単離後、TLC, ペーパークロマト (二次元), 旋光度により γ -エピカテキンと推定された。

終りに、旋光度の測定に便宜をはかって下さった理化学研究所農薬化学第一研究室主任小川智也博士に深謝します。

文 献

- 1) 益山新六: 油化学, **19**, 675 (1970).
- 2) 斎藤 浩: 油化学, **26**, 754 (1977).
- 3) 日本油化学協会編: 基準油脂分析試験法 2. 4. 12. -71.
- 4) 中林敏郎・木村 進・加藤博通: 食品の変色とその化学 (光琳書院, 東京), p. 64 (1967).
- 5) LEA, C. H. and HANNAN, R. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 518 (1950).
- 6) LEA, C. H. and HANNAN, R. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **5**, 433 (1950).
- 7) JACQUES, D., HASLAM, E., BEDFORD, G. F. and GREATBRAKES, D.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.*, No. 23, 2663 (1974).
- 8) GOLAN, A., KAHN, V. and SADOVSKI, A. Y.: *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1253 (1977).
- 9) PRABHA, T. N. and PATWARDHAN, M. V.: *J. Food Sci. Technol.*, **17**, 215 (1980).
- 10) RICHARD, E. L.: *Australian J. Chem.*, **18**, 1471 (1965).
- 11) ADACHI, S. and PATTON, S.: *J. Dairy Sci.*, **44**, 1375 (1961).
- 12) 加藤博通・藤巻正生: 栄養・食糧・醗酵・水質 外国文献会誌, **17**, 668 (1966).
- 13) LEA, C. H. and RHODES, D. N.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **9**, 56 (1952).

(昭和 57 年 1 月 9 日受理)

新 刊 紹 介

Vitamin C in Health and Disease

Basu, T. K. and Schorah, C. J. 著

ビタミン C が同定されてから 50 年たっているが、その生体内の働きが研究され始めたのはここ数年来にすぎない。特に、最近ではビタミン C とカゼあるいはガン予防との関連が話題となっている。しかし、本書は、このようなトピック的な点は避け、ビタミン C の生化学の最近の進歩について冷静に解説している。最後に、ビタミン C の摂取必要量として 60 mg/日を提唱しているが、200 mg/日あるいは短期間ならば数 g/日も何も毒性は示さないことを示し、ビタミン C 高摂取に強いて反対もしていない。ビタミン研究にたずさわる人にとって参考文献も豊富で良い参考書となる。

A 5 版 152 頁, 11.95 ポンド (英国内)

Croom Helm Ltd, 2-10 St Joh's Road, London, UK