

フキノール酸のラジカル消去能について

渡辺 悟 田崎弘之*¹ 三沢尚子 佐藤和恵*² 坂上 宏*³

Radical Scavenging Activity of Fukinolic Acid

SATORU WATANABE, HIROYUKI TAZAKI, NAOKO MISAWA,

KAZUE SATOH and HIROSHI SAKAGAMI

Radical scavenging activity of fukinolic acid (FA), chlorogenic acid (CGA), epigallocatechin gallate (EGCG) and gallic acid (GA) against superoxide anion (produced by HX-XOD reaction), hydroxyl radical (produced by Fenton reaction), nitric oxide (NO) (produced by NOC-7 with carboxy-PTIO) and DPPH radical was measured by ESR spectroscopy and OD method.

The radical scavenging activity of these compounds was in the following order: (1) superoxide anion, EGCG>GA>FA>CGA, (2) hydroxyl radical, EGCG>CGA>FA>GA, (3) NO, EGCG>FA>CGA, and (4) DPPH radical, EGCG>GA>FA>CGA (ESR method), EGCG>FA>CGA (OD method).

These data suggest that FA should be considered as a candidate of applicable antioxidant as well as other polyphenols.

フキは我が国原産で、韓国や中国にも分布するキク科の多年性草本で、独特な歯ざわりと香気の特徴とする食品素材である。

近年RP-HPLC技術によりフキから主要な4種のフェノール化合物が分離され、それらは、¹³C-NMRによりクロロゲン酸、3,5-ジカフェオイルキナ酸、3,4,5-トリカフェオイルキナ酸、そしてフキノール酸 (FA) であると同定された。

FAはこれまで *Petasites japonicus*¹⁾ と *Cimicifuga*種^{2,3)} から分離されており、いくつかの生物学的活性が報告されている。そ

れらは平滑筋を弛緩する作用⁴⁾、発芽抑制作用、 α -アミラーゼ阻害活性、カルボキシペプチダーゼA阻害活性⁵⁾、エストロゲン様活性⁶⁾、好中球エラスターゼ阻害活性⁷⁾ である。FAにはまた、コラーゲン溶解阻害活性がある⁸⁾。

しかしながらこれまで、FAのラジカル消去能についての詳細な報告はされていない⁹⁾。そこで、FAのラジカル消去能について他の代表的な抗酸化物質と比較して調べたのでここに報告する。

Keywords: Fukinolic acid, Radical, Scavenging activity

*1帯広畜産大学 畜産科学 2昭和大学 医学部 3明海大学 歯学部

材料と方法

1. 試薬

FA (fukinolic acid) はフキから抽出したものを使用した (詳細未掲載)。

HX (hypoxanthine) とXOD (xanthine oxidase) はシグマ社製のを、DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide)、SOD (superoxide dismutase・ウシの赤血球由来)、NOC-7 (1-hydroxyl-2-oxo-3-[*N*-3-methyl-3-aminopropyl]-3-methyl-1-triazene) およびcarboxy-PTIO (2-[4-carboxyphenyl]-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) は同仁化学研究所製のを、DETAPAC (diethylenetriaminepentaacetic acid)、DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)、CGA (chlorogenic acid)、EGCG (epigallocatechin gallate) およびGA (gallic acid) は和光純薬社製のを使用した。FA、CGA、EGCG およびGAの構造をFig. 1 に示した。

他のすべての試薬は市販品特級またはこれに準ずるものを使用した。

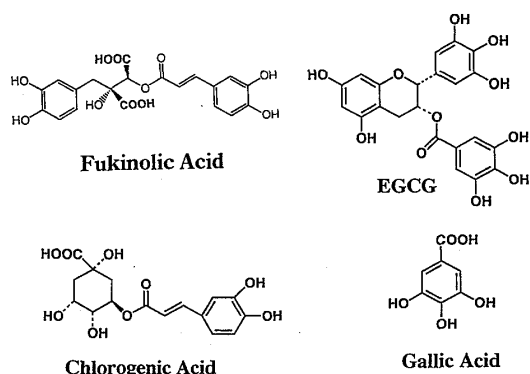


Fig. 1 Structures of fukinolic acid (FA), chlorogenic acid (CGA), epigallocatechin gallate (EGCG) and gallic acid (GA).

2. ESR法によるラジカル消去能の測定

(1) スーパーオキシドラジカル

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (HX-XOD) 反応系を使用して測定した。2 mM HX (0.1 Mリン酸緩衝液 (PB)、pH7.4) 50 μ L、0.5 mM DETAPAC 20 μ L、8% DMPO 30 μ L、0.1 M PB (pH7.4) 20 μ L、試料 (in

H₂O) 50 μ L、XOD (0.5 U/mL in PB) 30 μ Lをこの順序で混合した。ラジカル強度は混合1分後にESR (JEOL RE1X) で測定し、ラジカルのピーク高をMnO (外部標準) のピーク高で割った値をラジカルの相対強度とした。またスーパーオキシド消去活性はSODの検量線をあらかじめ作成しておき、SOD unit/mLとして表した。

(2) ヒドロキシルラジカル

1 mM FeSO₄ (含0.2 mM DETAPAC) 50 μ L、0.1 M PB (pH7.4) 50 μ L、92 mM DMPO 20 μ L、試料 (in H₂O) 50 μ L、1 mM H₂O₂ 30 μ Lを混合し、1分後にラジカル強度をESRで測定した。

(3) 一酸化窒素 (NO)

60 μ M NOC-7 (NO発生剤) と20 μ M carboxy-PTIO (NOトラップ剤) を30% DMSOを含む0.1 MのPB (pH7.4) 溶液中にて反応させ、3分後にラジカル強度をESRで測定した¹⁰⁾。

(4) DPPHラジカル

DPPH (200 μ M) のエタノール溶液 50 μ Lと試料のDMSO溶液50 μ Lをキャピラリーにとり、混合1分後にラジカル強度をESRで測定した。

3. 吸光度法によるDPPHラジカル消去能の測定

吸光度法によるDPPHラジカル消去能は、分光光度計 (島津社製・UV-2200型) にて517 nmの吸光度の減少により測定した。つまり、0.5 mM DPPH・エタノール溶液 1 mLと0.05 M Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) 900 μ Lに各試料100 μ Lを加え混合して10分以内で517 nmの吸光度を測定した。

結果および考察

1. ESR法によるラジカル消去能の測定結果

(1) スーパーオキシドラジカル

Fig. 2 に示すように、FA無添加 (0 μ M)

の時のラジカル強度を100%とし、添加するFA濃度を0.5、1、2 μM と増加させると、ラジカル強度は対照の60、45、31%まで低下した。つまり、FAはスーパーオキシドラジカルを1 μM という濃度で半分以下（45%）に消去し、SODの酵素単位に換算すると、スーパーオキシドラジカル消去能は1.03 SOD units/ μmol となった。

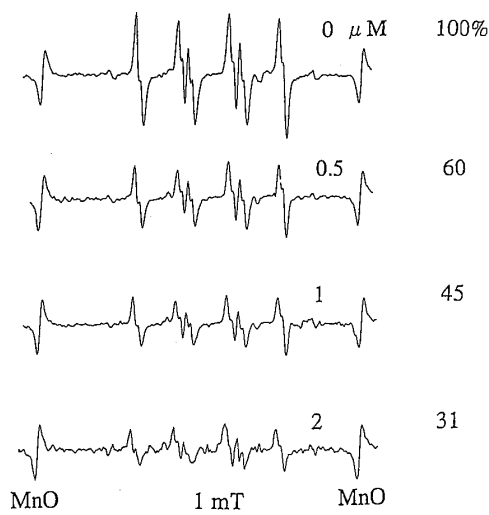


Fig. 2 ESR spectra of DMPO-OOH adduct (produced by HX-XOD reaction) in the presence of the indicated concentrations of FA.

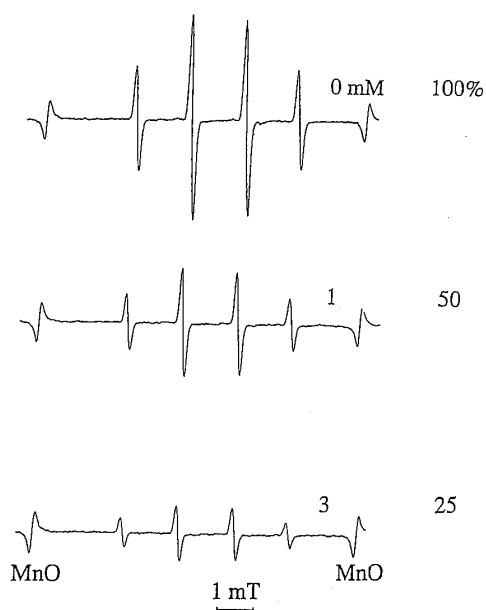


Fig. 3 ESR spectra of DMPO-OH adduct (produced by Fenton reaction) in the presence of the indicated concentrations of FA.

(2) ヒドロキシルラジカル

Fig. 3 に示すように、FA 1 mMで対照のほぼ50%、3 mMで25%までラジカル強度が減少した。50%消去濃度 (IC_{50}) は1.01 mMとなった。

(3) 一酸化窒素 (NO)

一酸化窒素 (NO) の消去はFig. 4 における*マークの (C-PTIOから生成された) C-PTIのピークの消失で測定でき、FA 20 μM 添加により53%までNOのピーク高が減少した。50%消去濃度 (IC_{50}) は、20 μM 以上であった。

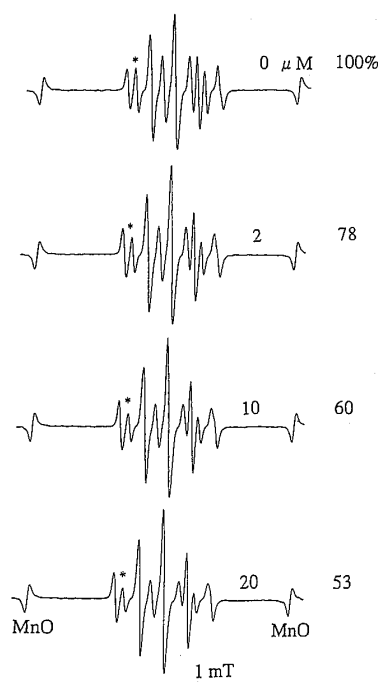


Fig. 4 ESR spectra of NO (produced by NOC-7 with carboxy-PTIO) in the presence of the indicated concentrations of FA.

(4) DPPHラジカル

DPPHラジカルの消去について調べた。DPPHラジカル強度はFA 5、25、50 μM の添加で、対照の75、42、21%まで減少した (Fig. 5)。FA 25 μM での消去率は58.2%となった。

さらにEGCG、GA、CGAの上記4種のラジカル消去能をESRにより測定した。ただしNOについては、GAによる消去能を測定しなかった。結果はまとめて表に示す (Table I)。

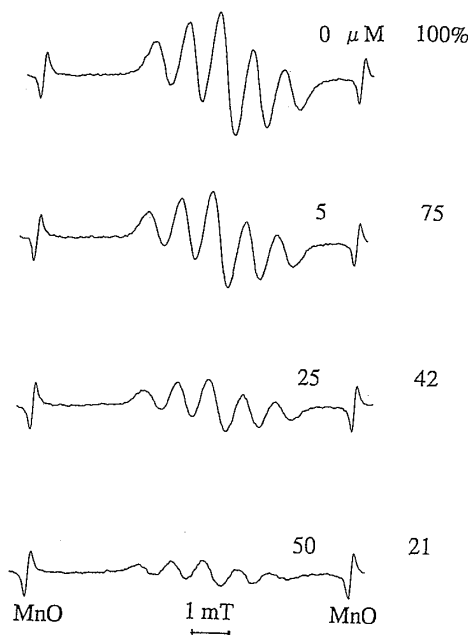


Fig. 5 ESR spectra of DPPH radical in the presence of the indicated concentrations of FA.

2. 吸光度法によるDPPHラジカル消去能の測定結果

先づ、CGA添加によるDPPHラジカル消去の検量線を作成した。種々の濃度のCGAを0.25 mMのDPPHを含む反応溶液に添加して、517 nmの吸光度を測定した (Fig. 6)。直線性があるCGA 0~0.8 mM、517 nmの吸光度0.655~2.482の範囲を検量線として使用した。

0.2 mM EGCGおよびFAを添加した結果、

517 nmの吸光度は1.257および1.411となり、Fig. 6 の検量線より0.525および0.470 mMのCGAに相当した。この結果よりCGAの消去能を1とすると、EGCGの消去能は2.63、FAの消去能は2.35と計算された。

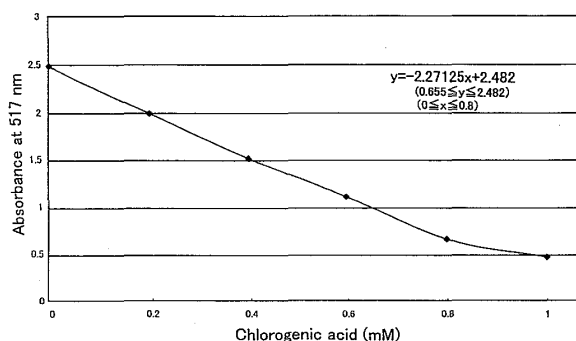


Fig. 6 Standard curve for the DPPH radical intensity (measured by absorbance at 517 nm) vs. concentration of CGA.

3. ラジカル消去能の比較

以上の結果をTable I にまとめた。Table I より、いずれのラジカルに対してもEGCGが最も強い消去能を示した。また、ヒドロキシルラジカル消去能はわずかにFAがCGAより低かったが、それ以外のラジカル消去能はFAがCGAより高かった。FAの方がCGAよりラジカル消去能が高いことは、Fig. 1 における構造を見て、FAがオルトジヒドロキシ構造を2つ有しており、CGAはそれを1つ有していることから推察される。しかし、

Table I Comparison of radical scavenging activity among four polyphenols.

| | Scavenging Activity | | | | |
|----------------------|------------------------|-------------------|------------------------|---------------------------------|--------------|
| | O_2^- | $\cdot OH$ | NO | DPPH radical | DPPH radical |
| | (SOD units/ μ mol) | (IC_{50} , mM) | (IC_{50} , μ M) | (% of inhibition at 25 μ M) | (OD method) |
| Fukinolic acid (F) | 1.03 | 1.01 | ≥ 20 | 58.2 | 2.35 |
| EGCG (E) | 3.19 | $\ll 1.00$ | < 20 | 100.0 | 2.63 |
| Gallic acid (G) | 2.40 | 1.31 | ND | 74.4 | ND |
| Chlorogenic acid (C) | 0.66 | < 1.00 | > 20 | 50.2 | 1 |
| Order | $E > G > F > C$ | $E > C > F > G$ | $E > F > C$ | $E > G > F > C$ | $E > F > C$ |

Radical intensity and scavenging activity of O_2^- (generated by HX-XOD reaction),

$\cdot OH$ (generated by Fenton reaction) and NO (generated from NOC-7) were measured by ESR spectrometer.

ND, not determined.

なぜヒドロキシルラジカルの消去能は、FAとCGAとで逆あるいは同等になるのか不明である。

スーパーオキシドラジカルの消去はDPPHラジカルの消去と相関があるように思える。それはスーパーオキシドラジカルの消去活性を%で表示するとFA、EGCG、GA、CGAは32.3、100、75.2、20.7%となり、DPPHラジカルにおける58.2、100、74.4、50.2%と良く対応しているからである。

一酸化窒素の消去と吸光度法によるDPPHラジカルの消去について、GAを測定しなかったが、今後測定してデータをとる必要がある。そうすれば、GAにおけるラジカル消去の特性がわかる可能性がでてくる。

CGAやEGCGは、抗酸化剤としての利用が期待されているが、今回の結果よりFAも同様に抗酸化剤として利用できる可能性が示唆された。

また、CGAやEGCGはヒト口腔癌の培養細胞のアポトーシスを誘導する¹¹⁾のでFAにも同様な作用があるか否か究明すべきである。

要約

今まで報告例のないフキノール酸 (FA) のラジカル消去能について、クロロゲン酸 (CGA)、エピガロカテキンガレート (EGCG)、没食子酸 (GA) と比較して検討した。

スーパーオキシドアニオン (HX-XOD反応で生成)、ヒドロキシルラジカル (フェントン反応で生成)、一酸化窒素 (NOC-7より生成) およびDPPHラジカル消去能はESR法を用いて測定した。またDPPHラジカル消去能は吸光度法でも測定した。

その結果、スーパーオキシドアニオン消去能はEGCG>GA>FA>CGAの順、ヒドロキシルラジカル消去能はEGCG>CGA>FA>GAの順、一酸化窒素消去能はEGCG>FA>CGAの順、ESR法で測定したDPPHラジカル消去能はEGCG>GA>FA>CGAの順、そして吸光度法で測定したDPPHラジカ

ル消去能はEGCG>FA>CGAの順となった。

本研究によりFAは抗酸化剤としての利用が期待できると考えられる。

本研究は、2004年度日本農芸化学会大会 (広島) の一般講演で口頭発表したことを付記する。

文献

- 1) SAKAMURA, S., YOSHIHARA, A. and TOYODA, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1795 (1969)
- 2) TAKAHIRA, M., KUSANO, A., SHIBANO, M., KUSANO, G., SAKURAI, N., NAGAI, M. and MIYASE, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 362 (1998)
- 3) TAKAHIRA, M., KUSANO, A., SHIBANO, M., KUSANO, G. and MIYASE, T.: *Phytochemistry*, **49**, 2115 (1998)
- 4) NOGUCHI, M., NAGAI, M., KOEDA, M., NAKAYAMA, S., SAKURAI, N., TAKAHIRA, M. and KUSANO, G.: *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1163 (1998)
- 5) KUSANO, G., TAKAHIRA, M., SHIBANO, M., KUSANO, A., OKAMOTO, Y., TSUJIBO, H., NUMATA, A. and INAMORI, Y.: *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 997 (1998)
- 6) KRUSE, S. O., LOHNING, A., PAULI, F. G., WINTERHOFF, H., and NAHRSTEDT, A.: *Planta Med.*, **65**, 763 (1999)
- 7) LOSER, B., KRUSE, S. O., MELZIG, M. F. and NAHRSTEDT, A.: *Planta Med.*, **66**, 751 (2000)
- 8) KUSANO, A., SEYAMA, Y., NAGAI, M., SHIBANO, M. and KUSANO, G.: *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1198 (2001)
- 9) BURDETTE, J. E., CHEN, S. N., LU, Z. Z., XU, H., WHITE, B. E. P., FABRICANT, D. S., LIU, J., FONG, H. H. S., FARNSWORTH, N. R., CONSTANTINOU, A. I., VANBREEMEN, R. V., PEZUTTO, J. M. and

- BOLTON, J. L.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7022 (2002)
- 10) SATOH, K., IKEDA, Y., SHIODA, S., TOBE, T., and YOSHIKAWA, T.: *Redox Report*, **7** (4), 219 (2002)
- 11) JIANG, Y., KUSAMA, K., SATOH, K., TAKAYAMA, F., WATANABE, S. and SAKAGAMI, H.: *Phytomedicine*, **7** (6), 483 (2000)
-