

## サラシア属植物 *Salacia reticulata* のスーパーオキシド アニオンラジカル捕捉作用

芳野 恭士\*<sup>1</sup>、勝亦 雄太<sup>1</sup>、筒井 千尋<sup>1</sup>、志賀 早祥<sup>1</sup>、芳野 文香<sup>1</sup>、片平 俊志<sup>1</sup>、  
山崎 純<sup>1</sup>、一杉 卓矢<sup>1</sup>、金高 隆<sup>2</sup>、古賀 邦正<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)

<sup>2</sup> 株式会社盛光 (〒411-0931 静岡県駿東郡長泉町東野 50-6)

<sup>3</sup> 東海大学 開発工学部 (〒410-0395 沼津市西野 317)

\*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

### Superoxide Anion Radical-scavenging Activity of Salacia Plant, *Salacia reticulata*

Kyoji YOSHINO<sup>1</sup>, Yuta KATSUMATA<sup>1</sup>, Chihiro TSUTSUI<sup>1</sup>, Saaki SHIGA<sup>1</sup>,  
Ayaka YOSHINO<sup>1</sup>, Shunshi KATAHIRA<sup>1</sup>, Atsushi YAMAZAKI<sup>1</sup>,  
Takuya HITOSUGI<sup>1</sup>, Takashi KANETAKA<sup>2</sup>, Kunimasa KOGA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Numazu College of Technology (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

<sup>2</sup> Seiko Co., Ltd (50-6 Higashino, Nagaizumi, Shizuoka 411-0931, Japan)

<sup>3</sup> Tokai University (317 Nishino, Numazu, Shizuoka 410-0395, Japan)

(Received November 2, 2015; Accepted November 24, 2015)

Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ )-scavenging activities of aqueous extracts prepared from powdered leaves and stems of a *Salacia* plant were investigated by the phenazine methosulfate-nicotinamide adenine dinucleotide-nitro blue tetrazolium method. At a final concentration of 0.1 mg/mL, the activities of the extracts of *Salacia* leaves and stems were higher than those of the extracts of coriander seed, although the activities of *Salacia* leaves and stems were lower than that of tea leaves. The activity of the *Salacia* leaf was higher than that of the stem. The mixture of mangiferin, (-)-epicatechin, and (-)-epigallocatechin exhibited the same abilities as compared with the extract of the *Salacia* leaf in concentrations expected to be included in the extract. Mangiferin, however, exhibited an inadequate ability as compared with the extract of the *Salacia* stem at the concentrations expected in 70  $\mu$ g/mL of the extract. This suggests that polyphenols could be the active  $O_2^{\cdot -}$ -scavenging components of the extracts of *Salacia* leaves and stems.

**Keywords:** *Salacia reticulata*, Antioxidant activity, Superoxide anion radical, Mangiferin, Catechin

#### 1. 緒言

スーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot -}$ )

や過酸化水素のような活性酸素種は、好気性生物体内のエネルギー代謝や免疫機構等において生

成されている。しかし、これらが過剰に生産されたりその代謝系に異常が生じて酸化ストレスが高まると、細胞に損傷を与えてリウマチ、肝炎、がん、動脈硬化、アルツハイマー型痴呆といった神経障害等、様々な疾病を引き起こすことが知られている[1]。そのため、トコフェロールやアスコルビン酸、植物ポリフェノールといった抗酸化剤を食品から摂取することは、体内の抗酸化系を補助して酸化ストレスを軽減することが期待される。

サラシア属植物は、東南アジアやブラジル等の熱帯から亜熱帯地域に広く分布する Hippocrateaceae 科のつる性の植物であり、インドやスリランカでは *Salacia reticulata* や *S. oblonga* の根や幹が、主に糖尿病の初期治療等に利用されてきた[2]。近年では、サラシア属植物のエキスについて、リウマチ性関節炎抑制作用や抗炎症作用とともに[3-5]、*in vitro*[6-10]や *in vivo*[6,11]の実験系での抗酸化作用が報告されている。*in vitro* におけるラジカルおよび活性酸素捕捉作用に関しては、サラシア属植物の根または幹の抽出物に 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) 由来ラジカル、 $O_2^{\cdot-}$ 、過酸化水素、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)由来ラジカル、次亜塩素酸および一酸化窒素を捕捉する作用が認められる。

ところで、これまでのサラシア属植物の使用部位は主に根や幹であったが、産地において希少植物となりつつあるサラシア属植物の過剰採取を防ぐためには、葉の利用が重要であると考えられる。サラシアの葉は、味や香りが幹と同様に弱くまた変色し難いことから、抗酸化作用を食品に付与する素材として適している。我々は、*S reticulata* の幹の抽出物と同様、その葉の抽出物にも *in vitro* および *in vivo* において、DPPH ラジカル、2,2'-アジノビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩由来ラジカルおよび *t*-ブチルヒドロペルオキシド由来ラジ

カルを捕捉する作用が認められることを報告している[12]。本研究では、スリランカ産の *S. reticulata* の葉と幹の水抽出物について、その抗酸化作用として  $O_2^{\cdot-}$  捕捉作用を *in vitro* で検討するとともに、その作用に寄与する含有成分の検討を行った。

## 2. 実験

*S. reticulata* を含む数種の天然物の抽出物を、次のように調製した。市販のクローブ (*Syzygium aromaticum*) の花蕾、コリアンダー (*Coriandrum sativum*) の種子、ローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) の葉、チャ (*Camellia sinensis*) の緑茶葉、盛光社のサラシア (*S. reticulata*) の葉および幹の乾燥物を、フードミルを使って微粉碎した。これに 9 倍量の水を加え、50°C、1 時間振盪抽出し、10°C、5,000 rpm で 20 分間遠心分離を行った。得られた上清を凍結乾燥することで、それぞれの抽出物を得た。収量は、クローブで 6.2%、コリアンダーで 3.6%、ローズマリーで 11.2%、チャで 17.2%、サラシアの葉で 17.3%、サラシアの幹で 6.1%であった[12,13]。

天然物の抽出物について、その  $O_2^{\cdot-}$  捕捉作用を次の方法で測定した。クローブの花蕾、コリアンダーの種子、ローズマリーの葉、チャの葉、サラシアの葉と幹のそれぞれの抽出物について、0.5 mg/mL の水溶液を調製した。これらの抽出物溶液 200  $\mu$ L に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) 200  $\mu$ L を加えて混合し、測定に用いるまで氷中で保存した。これらの溶液を 30°C で 5 分間予備加温した後、氷冷しておいた 15  $\mu$ M フェナジンメトスルフェート (PMS) 溶液、200  $\mu$ M ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 溶液、750  $\mu$ M 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) 溶液のそれぞれ 200  $\mu$ L ずつを加えて混合した。混合後、560 nm における吸光度を 5 分間測定し、吸光度の時間に対する変化量を求めた。試料の終濃度は 0.1

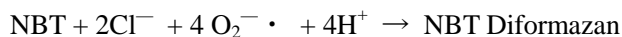
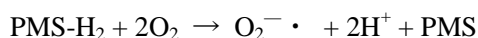
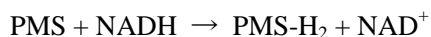
mg/mL となった。天然物の抽出物溶液の代わりに水を用いた場合の吸光度の変化量を 100% として、試料の  $O_2^-$ ・捕捉率を次の式により算出した[14]。

$$O_2^- \cdot \text{捕捉率}(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : 天然物抽出物溶液を使用した場合の吸光度の変化量

B : 水を使用した場合の吸光度の変化量

本方法では、次のような化学反応で  $O_2^-$ ・を発生させ、さらに  $O_2^-$ ・により生じる NBT ジホルマザンの 560 nm における吸光度を測定することで、 $O_2^-$ ・の量を測定している。試料を添加した時の、NBT ジホルマザンの生成抑制率を、 $O_2^-$ ・捕捉率として評価した。



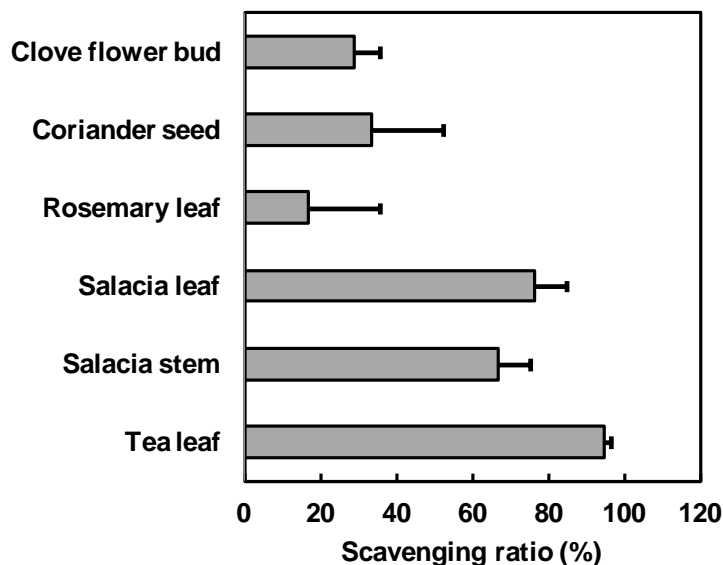
次に、サラシアの葉と幹およびチャの葉の抽出物について、同様の方法で試料の濃度と  $O_2^-$ ・捕捉率の関係を求め、既報[15]の方法に準じて  $O_2^-$ ・によって起こる NBT ジホルマザンの生成反応に対する 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$  値) を算出した。

サラシア属植物の中で、*S. reticulata* の根[6]、*S. chinensis* の幹[7]、*S. campestris* の根皮[8]に含まれる抗酸化成分としては、カテキン類、リグナン類、キサントン配糖体のマンギフェリン、トリテルペン類等が報告されている。我々も *S. reticulata* の葉や幹にマンギフェリンが、また、その葉にはさらに(-)-エピカテキン (EC) と(-)-エピガロカテキン (EGC) が含まれることを報告している[13]。そこで、サラシアの葉と幹の抽出物に含まれるポリフェノール成分として、シグマ社製マンギフェリンと和光純薬工業社製 EC および EGC について、

終濃度 20  $\mu\text{g/mL}$  の葉の抽出物と 70  $\mu\text{g/mL}$  の幹の抽出物に含まれる量を用いて、その  $O_2^-$ ・捕捉作用を測定した。20  $\mu\text{g/mL}$  の葉の抽出物の場合には、0.0025  $\mu\text{g/mL}$  のマンギフェリン、0.022  $\mu\text{g/mL}$  の EC、0.065  $\mu\text{g/mL}$  の EGC およびこれらの混合物を用いた。70  $\mu\text{g/mL}$  の幹の抽出物の場合には、0.70  $\mu\text{g/mL}$  のマンギフェリンを用いた。これらの各成分の量は、既報[13]の値を参考にして算出した。データは、それぞれ同様の実験を 3 回行い、その平均値  $\pm$  標準偏差で表した。

### 3. 結果および考察

反応液中の終濃度を 0.1 mg/mL とした場合のサラシアの葉と幹の抽出物の  $O_2^-$ ・捕捉率を、同様の抗酸化力を示すことが知られている天然物であるクローブ[16]、コリアンダー[17]、ローズマリー[18]およびチャ[19]の抽出物と比較した結果を Figure 1 に示す。サラシアの葉と幹の抽出物の  $O_2^-$ ・捕捉作用は、比較した 6 種の天然物の抽出物の中では、チャの葉の抽出物の次に強かった。サラシアの葉および幹の抽出物の比較では、サラシアの葉の抽出物の方が幹の抽出物よりも強い  $O_2^-$ ・捕捉作用を示した。そこで、サラシアの葉および幹とチャの葉の抽出物について、 $O_2^-$ ・による NBT ジホルマザン生成反応に対する  $IC_{50}$  値を求めた。それぞれの  $IC_{50}$  値は、チャの葉の抽出物で  $3.3 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$  と最も低く、次にサラシアの葉の抽出物で  $20.4 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$  であり、サラシアの幹の抽出物では  $71.8 \pm 9.7 \mu\text{g/mL}$  と最も高かった。これらの作用の強さの順は、終濃度を 0.1 mg/mL とした場合の結果と一致していた。本研究に用いたチャの葉、サラシアの葉およびサラシアの幹の抽出物中のポリフェノール含量は、没食子酸エチル相当量で、それぞれ 35.2%(w/w)、12.3%(w/w)、9.3%(w/w)である[13]。茶の葉に含まれる主なポリフェノール成分は、カテキン類であることが知られている[15]。サラシアの根や幹、



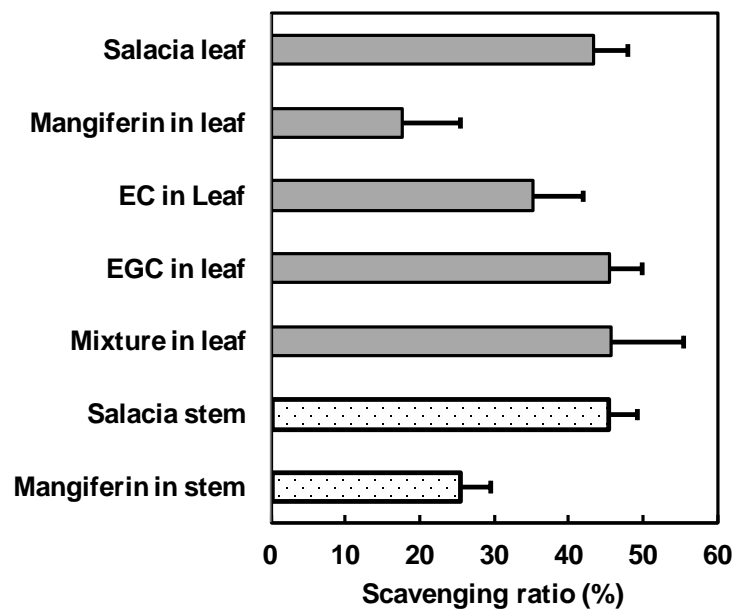
**Figure 1 Comparison of superoxide anion radical-scavenging activities of the extracts prepared from clove flower bud, coriander seed, rosemary leaf, Salacia leaf, Salacia stem, and tea leaf. Values are the mean  $\pm$  SD. N=3. Final concentration of each extract was 0.1 mg/mL.**

葉の主なポリフェノール成分もまた、マンギフェリンやカテキン類およびその誘導体と考えられる[6,13,20]。これらのことから、サラシアの葉や幹の  $O_2^-$ ・捕捉作用に、そのポリフェノール成分が寄与していることが予想される。そこで、終濃度 20  $\mu\text{g/mL}$  のサラシアの葉の抽出物と 70  $\mu\text{g/mL}$  のサラシアの幹の抽出物中に含まれるマンギフェリン、EC および EGC の量を用いて、その  $O_2^-$ ・捕捉作用を測定した。それぞれが示す捕捉率(%)を Figure 2 に示す。20  $\mu\text{g/mL}$  のサラシアの葉の抽出物は、43.3%の捕捉率を示した。この抽出物に含まれる量のマンギフェリン、EC、EGC の捕捉率はそれぞれ 17.7%、35.2%、45.4%で、これらの3つの成分を混合した場合の捕捉率は 45.8%であった。このことから、サラシアの葉の抽出物が示す  $O_2^-$ ・捕捉作用はこれらの成分の作用で説明することが可能で、特に作用が強かったのは EGC であった。また、70  $\mu\text{g/mL}$  のサラシアの幹の抽出物は、45.3%の捕捉率を示した。この抽出物に含まれる量のマンギフェリンの捕捉率は 25.4%で、

マンギフェリンのみでサラシアの幹の抽出物の  $O_2^-$ ・捕捉作用を十分に説明することは困難であった。今後、他の抗酸化成分について検討を行う必要があるものと考えられる。以上のことから、サラシアの葉および幹の抽出物は  $O_2^-$ ・捕捉作用を持つ食品素材であることがわかった。

#### 4. まとめ

サラシア属植物の葉および幹の水抽出物について、その  $O_2^-$ ・捕捉作用を、フェナジンメトスルフェート-還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド-NBT法を用いて検討した。サラシアの葉および幹の抽出物は、0.1 mg/mL の濃度において、チャの葉の抽出物よりは弱いもののコリアンダーの種子の抽出物に比較して強い  $O_2^-$ ・捕捉作用を示した。サラシアの葉の同作用は、幹に比較して強かった。20  $\mu\text{g/mL}$  のサラシアの葉の抽出物に含まれる量のマンギフェリン、EC、EGC の混合物の作用は、その抽出物と同程度であった。70  $\mu\text{g/mL}$  のサラシアの幹の抽出物



**Figure 2** Superoxide anion radical-scavenging activities of the extracts prepared from *Salacia* leaf and *Salacia* stem, and their phenolic compounds.

Values are the mean  $\pm$  SD. N=3. Final concentrations of the extracts prepared from *Salacia* leaf, mangiferin in leaf, (-)-epicatechin (EC) in leaf, (-)-epigallocatechin (EGC) in leaf, the mixture of these compounds in leaf, *Salacia* stem, and mangiferin in stem were 20.0  $\mu\text{g/mL}$ , 0.0025  $\mu\text{g/mL}$ , 0.022  $\mu\text{g/mL}$ , 0.065  $\mu\text{g/mL}$ , and the mixture in case of leaf; 70  $\mu\text{g/mL}$  and 0.70  $\mu\text{g/mL}$  in case of stem, respectively.

に含まれる量のマンギフェリンの作用は、その抽出物よりも弱かった。したがって、サラシアの葉および幹の抽出物の  $\text{O}_2^-$  捕捉作用における有効成分は、ポリフェノールであることが推測された。以上の結果から、サラシアの葉および幹の抽出物の摂取は、 $\text{O}_2^-$  代謝酵素であるスーパーオキシドジスムターゼおよび体内でのラジカル消去に関わる抗酸化性ビタミンやミネラルの働きを補助する効果があるものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) P.H. Indo, H.-C. Yen, I. Nakanishi, K. Matsumoto, M. Tamura, Y. Nagano, H. Matsui, O. Gusev, R. Cornette, T. Okuda, Y. Minamiyama, H. Ichikawa, S. Suenaga, M. Oki, T. Sato, T. Ozawa, K.D. St. Clair, J.H. Majima, A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol.56, pp.1-7 (2015).
- 2) 吉川雅之, 薬用食物の糖尿病予防成分 医食同源の観点から. 化学と生物, vol.40, pp.172-178 (2002).
- 3) Y. Sekiguchi, H. Mano, S. Nakatani, J. Shimizu, M. Wada, Effects of the Sri Lankan medicinal plant, *Salacia reticulata*, in rheumatoid arthritis. *Genes Nutr.*, vol.5, pp.89-96 (2010).
- 4) T.S. Ismail, S. Gopalakrishnan, V.H. Begum, V. Elango, Anti-inflammatory activity of *Salacia oblonga* Wall. and *Azima tetracantha* Lam. *J. Ethnopharmacol.*, vol.56, pp.145-152 (1997).
- 5) 芳野恭士, 近藤郁美子, 金高 隆, 古賀邦正, サラシア (*Salacia reticulata*) のマウス耳介皮膚における抗炎症作用. 技術・教育研究論文誌, vol.21, pp.45-51 (2014).

- 6) M. Yoshikawa, K. Ninomiya, H. Shimoda, N. Nishida, H. Matsuda, Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: Preventive effects of phenolic constituents on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, vol.25, pp.72-76 (2002).
- 7) A. Kishi, T. Morikawa, H. Matsuda, M. Yoshikawa, Structures of new friedelane- and norfriedelane-type triterpenes and polyacylated eudesmane-type sesquiterpene from *Salacia chinensis* LINN. (*S. prinoides* DC., Hippocrateaceae) and radical scavenging activities of principal constituents. *Chem. Pharm. Bull.*, vol.51, pp.1051-1055 (2003).
- 8) P.R.F. Carvalho, D.H.F. Silva, V.S. Bolzani, M. Furlan, Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. *Chem. Biodivers.*, vol.2, pp.367-372 (2005).
- 9) J.C.R. Velloso, N.M. Khalil, V.O. Gutierrez, V.A.F.F.M. Santos, M. Furlan, I.L. Brunetti, O.M.M.F. Oliveira, *Salacia campestris* root barkextract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile. *Braz. J. Pharm. Sci.*, vol.45, pp.99-107 (2009).
- 10) C.N. Chandrashekar, S. Madhyastha, S. Benjamin, K.K. Gopala, K.K. Srinivasan, Free radical scavenging activities and antidiabetic properties of various extracts of *Salacia reticulata*. *Thai J. Physiol. Sci.*, vol.21, pp.48-57 (2009).
- 11) K. Krishnakumar, K.T. Augusti, P.L. Vijayammal, Hypoglycaemic and anti-oxidant activity of *Salacia oblonga* Wall. extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, vol.43, pp.510-514 (1999).
- 12) 芳野恭士, 金高 隆, 古賀邦正, サラシア属植物 (*Salacia reticulata*) の抗酸化作用. 食品衛生学雑誌, vol.56, pp.144-150 (2015).
- 13) 芳野恭士, 岸 由紀乃, 金高 隆, 古賀邦正, *Salacia reticulata* の卵アルブミン誘発I型アレルギー反応におけるマウス腹壁血管透過性亢進抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌, vol.65, pp.221-227 (2012).
- 14) M. Nishikimi, N.A. Rao, K. Yagi, The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.46, pp.849-854 (1972).
- 15) 芳野恭士, 杉浦由佳, 篠原千恵, 廣田雅恵, フェノール化合物の抗酸化作用の測定と定量法に関する研究. 技術・教育研究論文誌, vol.11, pp.59-70 (2004).
- 16) Y.S. Yun, Y. Makajima, E. Iseda, A. Kunugi, Determination of antioxidant activity of herbs by ESR. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, vol.44, pp.59-62 (2003).
- 17) S. Satyanarayana, K. Sushruta, G.S. Sarma, N. Srinivas, G.V. Subba Raju, Antioxidant activity of the aqueous extracts of spicy food additives--evaluation and comparison with ascorbic acid in in-vitro systems. *J. Herb Pharmacother.*, vol.4, pp.1-10 (2004).
- 18) I.S. Kim, M.R. Yang, O.H. Lee, S.N. Kang, Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *Int. J. Mol. Sci.*, vol.12, pp.4120-4131 (2011).
- 19) T. Geetha, A. Garg, K. Chopra, I. Pal Kaur, Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutat. Res.*, vol.556, pp.65-74 (2004).
- 20) K. Koga, M. Hisamura, T. Kanetaka, K. Yoshino, Y. Matsuo, T. Tanaka, Proanthocyanidin oligomer isolated from *Salacia reticulata* leaves potently inhibit pancreatic lipase activity. *J. Food Sci.*, vol.78, pp.H105-111 (2013).