

作物の皮から有効成分を見つけよう

生物資源科学部 生物生産科学科

1年 長郷 理子 1年 明石 珠希

1年 五十嵐 茜李 1年 宇南山 雅乙 1年 佐藤 柚花

指導教員 生物資源科学部 生物生産科学科

助教 川上 寛子

【背景および目的】

普段、身の回りにある作物の皮や種などは廃棄されてしまうことが多い。しかし、漢方薬の原料として用いられる作物も存在し、有用な物質を含むことが分かっている。その廃棄されるものから有効成分を抽出することができれば、新しい資源として利用でき、廃棄物を有効活用可能と考えた。以上より、通常廃棄される作物の皮や種の抽出物が抗酸化活性を有するのか評価し、強い抗酸化活性が認められた成分を調査することを目的とした。

例えば、クルミ(図 1)は外皮(Husk)や実(Kernel)には抗酸化活性が見られることが分かっているが、内殻(Shell)についてはあまり調べられていない。そこで、内殻にはどのような抗酸化物質が含まれているのかについて興味を持ち、材料の1つとした。

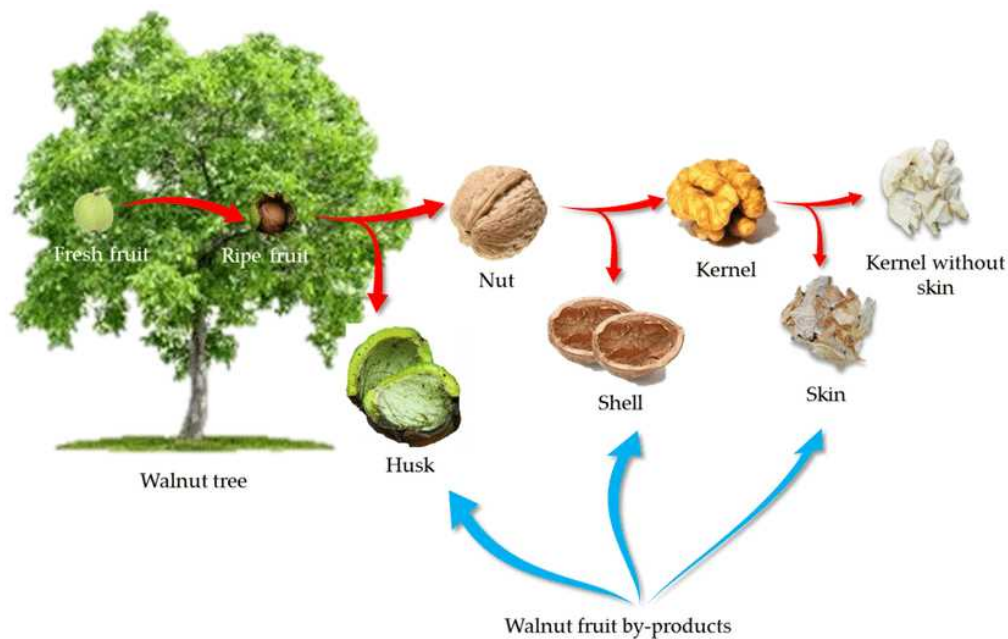


図 1 クルミの構造

(Jahanban-Esfahlan A et al., 2019 から引用)

【材料及び方法】

A) 抗酸化活性試験 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC法)

- ① 培養物を回収し、1.5 ml チューブに入れた後、17時間凍結乾燥した(クルミを除く)。クルミは、ハンマーとミルで粉碎した。凍結乾燥後のサンプルにメタノールを加え、振盪し、室温で抽出した。
- ② プレートリーダーの電源を入れ、励起波長・蛍光波長・温度などの測定条件を設定した。
 - カイネティクス測定条件
 - ・ 5分ごと、90分測定、37度
 - ・ 励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm
 - ・ 最初の測定前に混合 (10秒)
- ③ 濃度を 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/mlに調節したサンプルを50 ulずつ入れた。
- ④ 測定用プレート (Nunc F96 MicroWell 黒ポリスチレン製プレート, 237105, Thermo Fisher) へ 78 μ M Fluorescein sodium salt 溶液 (FL) を50 ulずつ、すべてのウェルへ分注した。
- ⑤ 各ウェルに50 μ Lの 132 μ M 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) 溶液を速やかに加えた。
- ⑥ 測定用プレートに蓋をし、37 °Cのインキュベータ内で15分間保温した。

B) 薄層クロマトグラフィーによる成分分析

展開液の組成は以下の 2 種類、クロロホルム：メタノール=7：3、酢酸エチル：トルエン：ギ酸=5：4：1 を用いた。標準物質として、没食子酸、ロスマリン酸、クエルセチン二水和物、クロロゲン酸、カテキンを 1 mg/ml に調整して分析した。サンプルとして、アボカド、クルミのメタノール抽出物をスポットした。これらの抗酸化成分を検出するために、展開後の TLC シートに 0.2 % 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 溶液を噴霧した。また、硫酸を噴霧し、100 °Cで加熱した。

- ① 縦10 cmのTLC (Slica gel 60RP-18 F254 s, 1.05559.0001, メルク・ジャパン株式会社) の薄層表面上から5 mm、下から15 mmのところに線を引き、エキスと比較試料をスポットした。
- ② 展開槽に溶媒を5 mmの高さまで入れ、展開槽に展開溶媒が充満するまで待った。
- ③ サンプルをスポットしたTLCシートを展開槽に入れ、TLC上部の線まで展開させた。
- ④ TLCシートを取り出し、乾燥させた後UVランプでサンプルのスポットを確認した。
- ⑤ 抗酸化成分を検出するために 0.2 % DPPHを噴霧した。
- ⑦ 硫酸を噴霧し、100 °Cで加熱した。

【結果】

A) 抗酸化活性試験

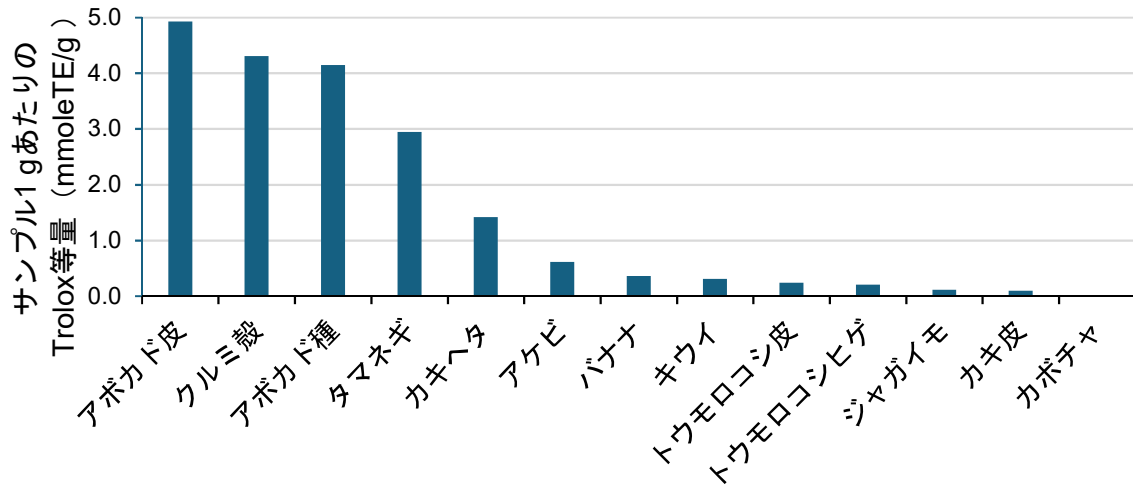


図 2 各サンプルの抽出物 1 gあたりの Trolox 等量の比較

全サンプルの中でアボカドの皮が 4.9 mmoleTE/g、クルミの殻が 4.3 mmoleTE/g と、非常に高い抗酸化活性が見られた。(図 2)

B) 薄層クロマトグラフィーによる成分分析



サンプルを TLC によって成分分析した結果を

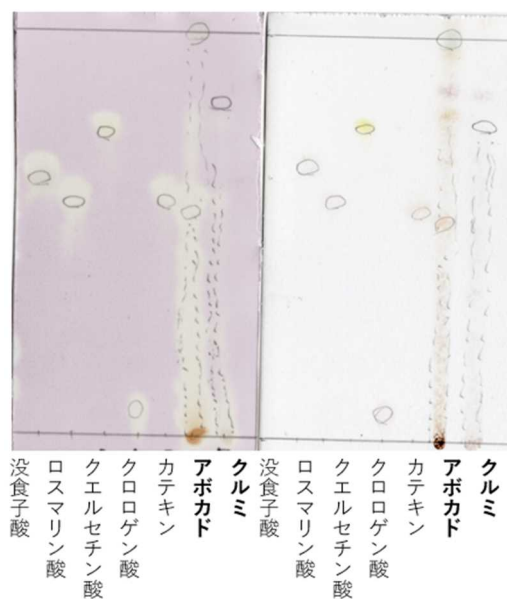


図 3 に示す。

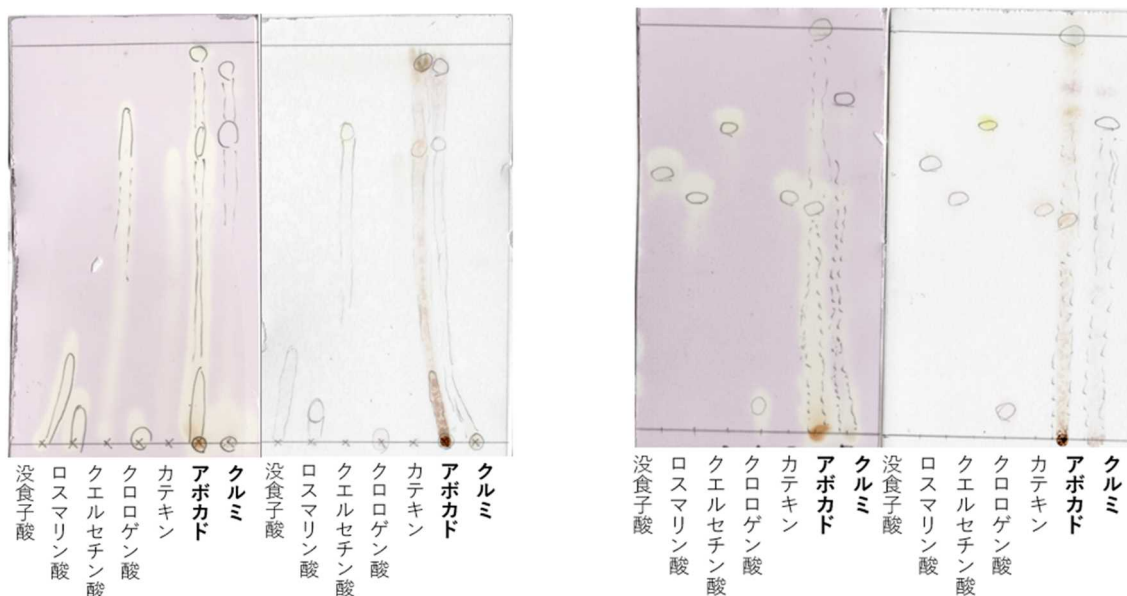


図 3 展開溶媒にクロロホルム：メタノール=7：3（左）と酢酸エチル：トルエン：ギ酸=5：4：1（右）を用いた TLC 分析結果（左：DPPH 噴霧、右：硫酸噴霧後加熱）

図 3 より展開溶媒にクロロホルム：メタノール=7：3 を用いた TLC 分析により、アボカド皮、クルミ殻に含まれる抗酸化物質の存在を確認できたものの、この展開溶媒では明確に分離されたスポットを得ることが困難だった。クロロゲン酸、カテキンのスポットと同様の Rf 値を示すスポットがアボカド皮、クルミ殻にも確認された。

次に展開溶媒を酢酸エチル：トルエン：ギ酸=5：4：1 に変更して TLC 分析したところ、同様にサンプルの単離がうまくできなかった。TLC の結果、カテキンのスポットと同様の Rf 値を示すスポットがアボカド皮に確認された一方、他の標準物質と完全に一致するスポットは見出されなかった。

【考察】

アボカドについての研究は多く報告されており、皮や種に含まれている抗酸化物質が数種明らかになっている (Bhuyan et al., 2019, Lyu et al., 2023)。我々は論文で報告されている既知の抗酸化物質を用いて TLC 分析を行った。今回の実験では、アボカド皮の粗抽出物を分析しており、多数の物質の存在により分離が不十分で抗酸化物質の同定が困難だった。よって、今後、分離及び精製操作を行なった後に再度比較することで、抗酸化物質の同定が可能と考えられる。

加えて、クルミ殻抽出物も強い抗酸化活性が見られたが、アボカド同様にテーリングし、TLC で詳細に成分を特定することができなかった。クルミの殻の化学成分と機能的利用に関する論文によると、クルミの外皮にはエラグ酸やタンニン酸などのフェノール類が多く含まれている (Jahanban-Esfahlan et al., 2019)。今回用いた標準物質もクルミで報告された既知成分であったが、その他の既知抗酸化物質を比較対象に追加し、分離条件を検討することで、クルミの殻に含まれる抗酸化物質が同定できると考えられる。

クルミの殻は硬く加工しづらい。そこで、この硬さを利用して、クルミの殻の粉末で角質除去作用が期待できないかと着想した。そこにクルミのエキスを添加することで、エキスに含まれると推測されるタンニン酸の角質剥離保護効果もたらされ、過剰な角質剥離を防ぐことができるのではないかと考えた。また、タンニン酸には収斂作用があることで制汗剤としても利用でき、消臭効果も期待できるだろう。今後、抗酸化物質の同定のほか、クルミ殻の更なる活用方法について多角的に検討したい。

【参考文献】

化粧品成分事典 監修：小澤王春、発行：松井雅彦、発行元：萬株式会社

Jahanban-Esfahlan A., Ostadrahimi A., Tabibiazar M., and Amarowicz R. (2019). A comprehensive review on the chemical constituents and functional uses of walnut (*Juglans* spp.) husk

Bhuyan D. J., Alsherbiny M. A., Perera S., Low M., Basu A., Devi O. A., Barooah M. S., Li C. G and Papoutsis K. (2019). The odyssey of bioactive compounds in avocado (*Persea americana*) and their health benefits. *Antioxidants*, 8(10), 426-479

Lyu X., Agar O. T., Barrow C. J., Dunshea F. R., and Suleria H. A. (2023). Phenolic compounds profiling and their antioxidant capacity in the peel, pulp, and seed of Australian grown avocado. *Antioxidants*, 12(1), 185-207

Jahanban-Esfahlan A., Ostadrahimi A., Tabibiazar M., and Amarowicz R. (2019). A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit and tree. *Molecules*, 24(11), 2133-2173

Jahanban-Esfahlan A, Ostadrahimi A, Tabibiazar M, Amarowicz R. A (2019). Comprehensive Review on the Chemical Constituents and Functional Uses of Walnut (*Juglans* spp.) Husk. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16):3920-3957