

芍薬の化学的研究(第5報) 芍薬の変色について

Chemical Studies on Paeoniae Radix (Part 5)
Discoloration of Paeoniae Radix

林 隆章, 桂 英二, 金島 弘恭, 山岸 喬

Takaaki Hayashi, Eiji Katsura, Hiroyasu Kaneshima and Takashi Yamagishi

緒 言

芍薬は、鎮痛、鎮静、鎮痙作用を持ち、漢方処方の40%に配合される重要な生薬の一つであり、シャクヤク (*Paeoniae albiflora* PALL.) の根より調製される。道内生産量は国内生産量の約4割を占めるが、道産の芍薬には褐色または青紫色に変色したものが多く、道産品の生産振興を図るためにも、変色を起こさない調製法の確立が望まれている。

変色の原因は、前報¹⁾で報告したような芍薬に含まれるタンニンと金属とのキレート形成による変色以外に、酵素によるタンニンの酸化、重合、分解等による変色が考えられる。酵素が関与する変色については、すでに食品についてよく研究されており、ポリフェノールオキシダーゼによるフェノール類の酸化が変色の原因の一つと考えられている²⁾。芍薬においても同様な現象が生ずると予想されるので、シャクヤクから調製した粗酵素液を用いて、ポリフェノールオキシダーゼの性質および芍薬に含まれるフェノール類であるガロタンニン³⁾に対する作用について調べた。

実験方法

1. 材料および試薬

当研究所薬草園で栽培したシャクヤク (*Paeoniae albiflora* PALL.) の根を、1982年10月に採取し、水洗後細切したものを実験に用いた。変色した芍薬 (No 1~5) は、北海道生薬公社 (名寄) で調製加工したものから選別し実験に用いた。変色していない試料 (No 6) として、国立衛生試験所北海道薬用植物栽培試験場 (名寄) で栽培し、調製加工した芍薬を用いた。1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl- β -D-glucose (PGG) は芍薬より分離精製したものを³⁾を用いた。試薬はすべて特級品を使用し、(+) カテキンはシグマ、他のものは和光純薬製を用いた。

2. 粗酵素液の調製

細切したシャクヤクの根に冷アセトン (-20℃) を加えてワーリングブレンダーで破碎し、ガーゼ2枚でろ過した。

残渣はさらに破碎し同様にろ過した。ろ液を合わせブフナーロートで吸引ろ過した。残渣を冷アセトンで洗浄後、真空デシケーター中で乾燥してアセトンパウダーとした。次にアセトンパウダー5gあたり、0.05Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 25mlを加えて、氷冷下で30分間攪拌抽出し、3000rpmで15分間遠心分離後、上清を粗酵素液として実験に用いた。

3. 酵素活性の測定法

(1) 吸光度法

基質 (最終濃度10mM) を含む0.05Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 2.5mlに粗酵素液0.5mlを加え、30℃で15分間反応を行った。活性は基質の酸化による420nmの吸光度の増加を測定して求め、1分間あたり吸光度を0.001増加させる活性を1単位(U)とした。

(2) ワールブルグ検圧法

ワールブルグ検圧計の主室に0.5Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 0.1mlおよび粗酵素液0.8ml、側室に100mM基質溶液0.1mlおよび副室に20%水酸化カリウム溶液0.1ml、ろ紙片 (1.5×2cm) を入れ、30℃で反応を行った。活性は酸素の消費量を測定して求め、1分間あたり1 μ lの酸素を消費する活性を1単位(U)とした。

4. 蛋白質の定量

Lowry⁴⁾の方法に従い、ウシ血清アルブミンを標準として行った。

5. 粗酵素液によるペンタガロイルグルコース (PGG) の酸化生成物の分析

PGG水溶液 (1.0mg/ml) 1.5mlに1Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 0.2ml、粗酵素液1.0mlを加え、24時間室温で反応させた。反応液をポアサイズ0.45 μ mのメンブランフィルターを用いてろ過し、ろ液をHPLCで分析した。HPLCは下記の条件で行った。

機 器：日立638型高速液体クロマトグラフ

カラム：Nucleosil 5C₁₈ (4 ϕ ×250mm)

カラム温度：35℃

移動相：18% CH₃CN (1% AcOH)

流 速：1.0ml/min

測定波長：280, 354 nm

注入量：15 μ l

6. 芍薬の変色物質の抽出およびHPLCによる分析

芍薬を48メッシュのふるいを通して大きさに粉砕し、そのうち約5 gを50 mlの共栓付遠沈管に入れ、50%アセトン20 mlを加え2時間振とう抽出した。抽出液を遠心分離後、上清10 mlをとり減圧下溶媒を留去した。残渣を水-酢酸エチル（各20 ml）で溶媒間分配し水層をとり、減圧下溶媒を留去した。残渣を水2 mlに溶解しHPLCの試料とした。

HPLCは前項と同条件で行った。

実験結果および考察

1. 粗酵素液のポリフェノールオキシダーゼ (PPO)

の性質

(1) 基質特異性

粗酵素液を用いて種々のフェノール化合物の酸素消費量および吸光度の変化について調べた結果は、Table 1に示すとおりである。粗酵素液は、1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼンの構造を有する没食子酸およびピロガロールを強く酸化し、反応液を速やかに褐変させた。また、*o*-ジフェノール構造を有するカテコールおよび(+)-カテキンもわずかに酸化され褐変したが、1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンの構造を有するフロログルシノール、*m*-ジフェノールの構造を有するレゾルシノールおよびL-チロシン、フェノールなどのモノフェノール類は酸化されず、褐変しなかった。

Table 1 Oxidation of Various Phenolic Compounds by Crude Enzyme from Paeony Root

	Increase of OD	O ₂ uptake
	at 420 nm (U/mg)	(U/mg)
Gallic acid	266	—
Pyrogallol	59	1.73
Phloroglucinol	0	0
Catechol	2	0.04
Resorcinol	0	0
L-Tyrosine	0	—
Phenol	0	—
(+)-Catechin	3	—

今回、粗酵素液の基質特異性について検討した結果、没食子酸に対して強い活性を持つことが示されたが、没食子酸はきわめて自動酸化されやすく、酵素活性測定に不適と考えられるので、以下の実験では、基質としてピロガロールを用い、吸光度法で酵素活性を測定した。

(2) 至適 pH

粗酵素液のピロガロール酸化に及ぼすpHの影響を調べた結果、Fig. 1に示したようにpH 7.2で最も高い活性を示した。

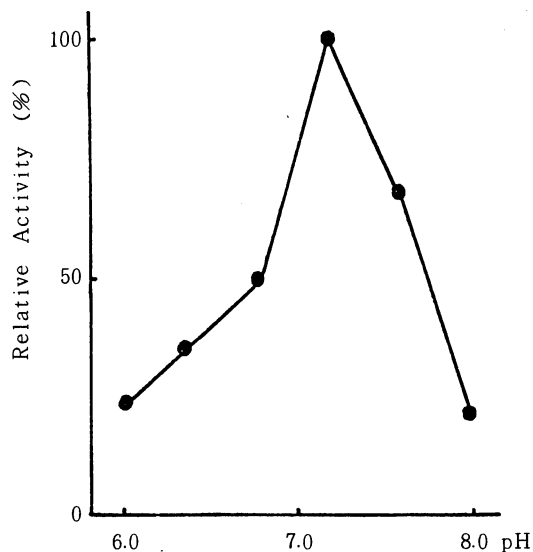


Fig. 1 Effect of pH on Polyphenol Oxidase Activity

The reaction was carried out for 15 minutes at 30° in 0.05 M phosphate buffer.

(3) 熱安定性

40~100℃の種々温度条件で粗酵素液を5分間加熱処理した後、吸光度法で残存活性を測定した。残存活性は、加熱処理前の粗酵素液の活性を100としてそれに対する相対値で表わした。その結果、Fig. 2に示したように、40℃で5分間加熱した場合ではほとんど失活しなかったが、それより高い温度になると急激に失活し、60℃5分間加熱するだけで約90%失活した。

(4) 阻害剤の影響

種々の化合物を最終濃度1 mMになるように添加し、これらのピロガロール酸化に及ぼす影響を調べた。活性は無添加の場合を100とした相対値で表わした。その結果はTable 2に示すように、粗酵素液のピロガロール酸化活性は、金属酵素の阻害剤であるシアン化カリウム、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムにより阻害された。また、抗酸化剤であるL-アスコルビン酸によって活性は阻害された。しかし、フェリシアン化カリウムの場合はやや弱く、

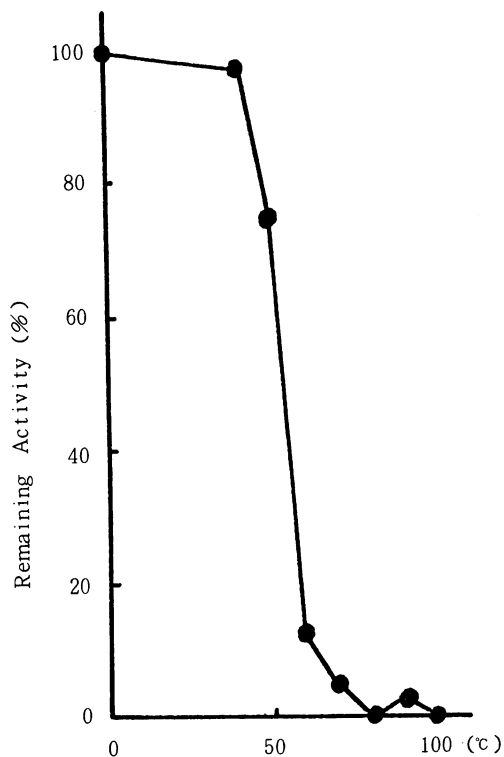


Fig. 2 Thermal Stability of Polyphenol Oxidase
Crude extracts were heated at various temperature for 5 minutes.

Table 2 Effect of Various Compounds on Polyphenol Oxidase Activity

Compound	Relative activity (%)
None (control)	100
Potassium cyanide	0
Sodium diethyldithiocarbamate	0
Potassium ferricyanide	61
Thiourea	89
Sodium fluoride	97
L-Ascorbic acid	0
CoCl ₂	145
MgSO ₄	77
MnCl ₂	98
ZnSO ₄	102

Final concentration of various compounds was
1 × 10⁻³ M.

約40%阻害された。金属イオンの影響について調べた結果、Mg²⁺はわずかに活性を阻害したが、Co²⁺は逆に1.4倍賦活化した。Mn²⁺、Zn²⁺は活性にほとんど影響しなかった。なお、Cu²⁺、Fe²⁺、Ni²⁺は、ピロガロールと反応するため、これらの影響については検討できなかった。

2. 粗酵素液によるタンニンの酸化生成物の分析

芍薬にはフェノール成分として、カテキン類で構成されている縮合型タンニンおよび没食子酸とグルコースから構成されているガロタンニン³⁾が含まれているが、一方、粗酵素液の PPO の基質特異性について検討した結果、没食子酸に対して、(+)カテキンの約100倍の高い活性を示した。このことより、ガロタンニンを芍薬の酵素的褐変に関与する主要な原因物質と考え、ガロタンニンの構成成分であるペンタガロイルグルコース (PGG) を粗酵素液と反応させ、その反応生成物について調べた。PGG を粗酵素液で処理すると、PGG が酸化され褐色に着色するので、この溶液の紫外および可視スペクトルを測定した。その結果 PGG の吸収以外に新たに354nm に吸収が認められたので着色物質を確認する目的で、354nm でモニターし、HPLC で分析した。その結果、Fig. 3に示すように、354nm に吸収を持つピーク A を保持時間17分のところに認めた。このピーク A の化合物が芍薬の変色物質の一つと考えられるので、変色した芍薬中のこの化合物の存在を HPLC で調べた。

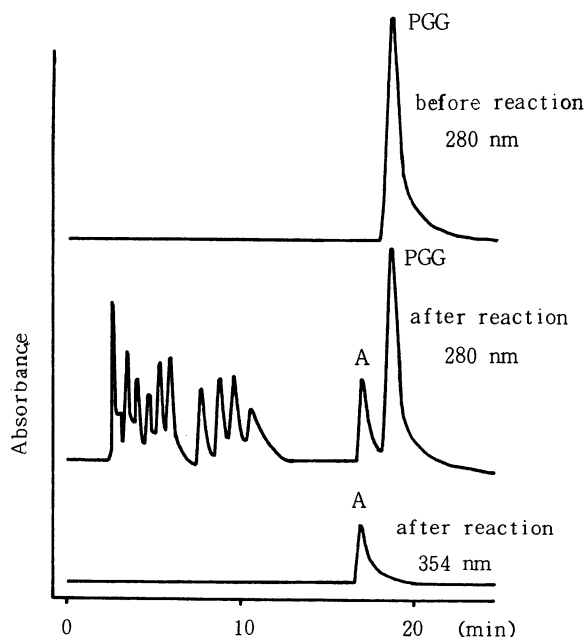


Fig. 3 HPL Chromatograms of Oxidized Product of PGG

A : oxidized product

PGG : 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl-β-D-glucose

また、変色していない芍薬についても同様に調べた。Fig. 4に示すように、変色していない芍薬 (No 6) 以外の芍薬 (No 1~5) にはすべてピーク A が認められたことから、ピーク A が芍薬の変色物質の一つであると考えられる。

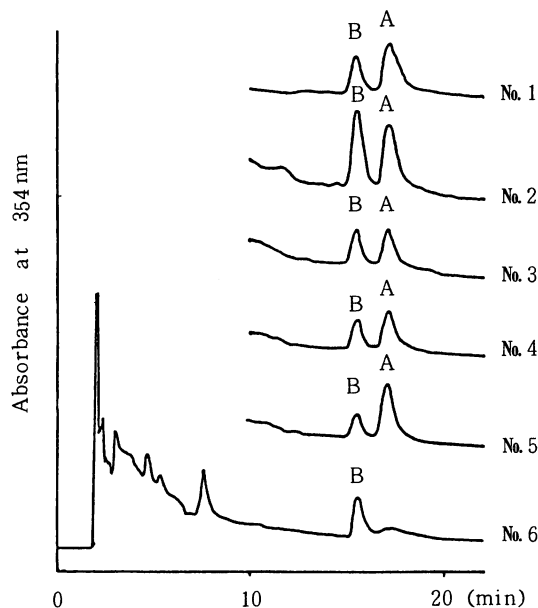


Fig. 4 HPL Chromatograms of 50% Acetone Extracts of *Paeoniae Radix*

A : oxidized product, B : unknown, No. 1-5 : discolored samples, No. 6 : not discolored sample

結 語

1. シャクヤクの根から調製した粗酵素液は PPO 活性を有し、没食子酸およびピロガロールを強く酸化し、その溶液を褐変させた。

2. この PPO 活性を有する粗酵素液は、ガロタンニンの一つであるペンタガロイルグルコースを酸化し、354 nm に吸収を持つ化合物を生成した。この化合物は、変色した芍薬のみに認められた。

3. ガロタンニンの酵素的酸化生成物が芍薬の変色物質の一つであると推定されるので、芍薬の調製加工中の変色を防止するには PPO 活性を抑制するように工夫する必要がある。

文 献

- 1) 林隆章 他：道衛研
- 2) (a) 中村敏郎：日本食品工業学会誌, **15**, 116 (1968)
- (b) C. Skalski, W. A. Sistrunk : J. Food Sci., **38**, 1060 (1973)

- (c) N. De J. Rivas, J. R. Whitaker : Plant Physiol., **52**, 501 (1973)
- (d) B. S. Luh, B. Phitakpol : J. Food Sci., **37**, 264 (1972)
- (e) M. B. Pendharker, P. M. Nair : Phytochem., **13**, 1373 (1974)
- (f) P. Thomas, P. M. Nair : Phytochem., **10**, 771 (1971)
- (g) 大島康義 他：日農化 **27**, 508 (1973)
- 3) M. Nishizawa et al : Chem. Pharm. Bull., **28**, 2850 (1980)
- 4) O. H. Lowry et al : J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951)

Chemical Studies on *Paeoniae Radix* (Part 5) Discoloration of *Paeoniae Radix*

Takaaki Hayashi, Eiji Katsura, Hiroyasu Kaneshima and Takashi Yamagishi

In order to clarify the cause of discoloration of *Paeoniae Radix* during preparation, the property of polyphenoloxidase (PPO) in the crude enzyme from peony root was studied.

The crude enzyme showed PPO activity against gallic acid, pyrogallol, catechol and (+)-catechin. The optimum pH of PPO was 7.2. Ninety percent of the activity was lost when heated at 60°C for 5 minutes. It was inhibited by potassium cyanide, sodium diethyldithiocarbamate, potassium ferricyanide, L-ascorbic acid and Mg^{2+} , but was activated by Co^{2+} .

It showed higher activity against gallic acid than (+)-catechin. When 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl- β -D-glucose which is a constituent of gallotannin in peony root was mixed with the crude enzyme solution, it turned intensely brown and formed an oxidized product having an absorption at 354 nm. The oxidized compound was detected by high performance liquid chromatography only in the discolored *Paeoniae Radix*.

These results suggested that the enzymatic reaction of PPO with gallotannin was the cause of the brown discoloration of *Paeoniae Radix*.