

## イチジク茶に含まれるフロクマリンの低減方法の検討

小山 ゆかり, 阿部 竜也

### A Simple Low-temperature Leaching Method to Reduce Furocoumarin in Fig (*Ficus carica* L.) Leaf Tea

Yukari Koyama and Tatsuya Abe

A tea infusion made from fig (*Ficus carica* L.) leaves shows an anti-allergenic effect. However, many fig cultivars contain furocoumarins, such as psoralen and bergapten, which when ingested at high doses can cause phototoxicity and inhibit cytochrome P450 enzymes. In this study, we examined the efficacy of a simple low-temperature leaching method in reducing furocoumarins. In this method, low leaching temperatures were associated with reduced amounts of eluted furocoumarin (after 120 min at 0.1°C, the total eluted furocoumarin content was 36% lower than that after 3 min at 80°C). The degranulation inhibitory effect was equivalent under both conditions. These results suggest that low-temperature leaching of fig leaf tea suppresses the amount of furocoumarin eluted, thereby improving its safety profile.

Key words: fig leaf tea, furocoumarin, psoralen, bergapten, low-temperature leaching

#### 緒言

我々はこれまでに、イチジク (*Ficus carica* L.) の葉を加工したイチジク茶の抗アレルギー効果を培養細胞試験および動物実験により見出している<sup>1)</sup>。その作用機序は、好塩基球に結合したIgE抗体を解離させることで脱顆粒を抑制するものであり、食品素材としては新規な作用機構である。イチジク茶の機能性表示食品としての開発を目指しているが、イチジクの多くの品種には、葉にプソラレンやベルガプテンといったフロクマリンが含まれている<sup>2)</sup>。フロクマリンは、フラン環とクマリンが縮環した有機化合物の総称であり、外敵防御機構として多くの植物で合成されている。フロクマリンを含む食品あるいは漢方素材として、グレープフルーツ、ダイダイ、パセリ、セロリ、イチジク葉、トウキ、ジャクシおよびボウフウ等が挙げられる<sup>2-6)</sup>。フロクマリンは、血圧低下作用などの健康効果が報告されている一方で、光毒性作用や薬物代謝酵素阻害作用などの健康被害を生じることが報告されている<sup>7-10)</sup>。したがって、イチジク茶を高用量で摂取した際には、これらの健康被害が懸念される。フロクマリンを含まないイチジク品種も存在するが、国内主要品種の柘井ドーフィンや蓬萊柿はいずれもフロクマリンを含有している。そこで我々は、国内主要品種を原料利用したイチジク茶の安全性向上を目的に、フロクマリンの低減方法を検討した。グレープフルーツジュースのフロクマリン除去方法として、有機溶剤と合成吸着剤を用いた方法が報告されているが、非常に煩雑で

ある<sup>11)</sup>。そこで我々は、イチジク茶に適用できる簡便なフロクマリン低減方法として、低温浸出法を試みた。緑茶は低温で浸出することで、カテキンやカフェインの溶出量が低減されることが報告されている<sup>12,13)</sup>。イチジク茶においても、浸出温度を変更することで、含有成分の溶出量が変化する可能性が考えられた。そこで本試験では、0.1~20°Cの冷水でイチジク茶を浸出し、プソラレンおよびベルガプテンの溶出量を測定した。フロクマリン以外の成分の溶出量を確認するため、イチジク茶含有ポリフェノールのケルセチン3-マロニルグルコシド(Q3MG)およびルチン、イチジク特有の糖質であるジフルクトース無水物(DFA)を定量した。低温浸出茶液の脱顆粒抑制効果は、ラット好塩基球性白血病細胞株RBL-2H3を用いて評価した。イチジク茶の他に、フロクマリン含有茶であるトウキ葉茶についても同様に検討した。トウキ葉茶は、漢方素材であるトウキ(使用部位は根)の葉を乾燥させて作られた茶であり、これまでに血管拡張作用や冷え性改善の効果が報告されている<sup>14)</sup>。トウキ葉茶の含有フロクマリンは、主にベルガプテンとキサントトキシンである<sup>14)</sup>。これらの茶葉を用いて、種々の浸出温度および時間におけるフロクマリン溶出量を測定し、低温浸出法の有効性を評価した。

#### 方法

##### 1. 試料および試薬

イチジク葉は、収穫当日に水道水およびイオン交換水で

洗浄した後、約 2 cm 角に切断した。その後、コンビオーブン (FCCM202, フジマック) を用いて 90 °C, 4 分間で蒸煮した。室温で 20 分間風乾した後、食品乾燥機 (ドラッピー DSJ-7-3A, 静岡製機) で 60 °C, 4 時間乾燥させ、イチジク茶を製造した。本試験では、浸出効率の均一化を図るため、茶葉はミル (IFM-720G, 岩谷産業) で粉碎して使用した。トウキ茶葉は、農業生産法人有限会社ポニーの里ファームより購入し、同様にミルで粉碎した。プソラレン、ルチンおよび DFA は富士フィルム和光純薬、ベルガプテンは東京化成工業、Q3MG, マウスモノクローナル抗ジトロフェニル (DNP)-IgE 抗体および *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニドは Sigma-Aldrich より購入した。

## 2. イチジク茶の浸出

浸出温度の検討では、イチジク茶葉 1.0 g に種々の温度 (0.1 ~ 20 °C) の超純水 80 mL を加え、それぞれ 120 分間浸出した。浸出後、ナイロンネット (目開き 48  $\mu$ m) で茶葉を取り除き、超純水で全量 100 mL とした。熱水浸出は、イチジク茶葉 1.0 g に 80 °C の超純水 80 mL を加えて 3 分間浸出した後、超純水で全量 100 mL とした。浸出時間の検討では、イチジク茶葉 1.0 g に 0.1 °C の超純水 80 mL を加え、種々の時間で浸出した後、超純水で全量 100 mL とした。浸出液は、0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過した後、分析に供した。

## 3. LC/MS 分析

茶液中のフロクマリンおよびフロクマリン以外の成分 (Q3MG, ルチンおよび DFA; 以下、非フロクマリン成分) 含量の測定は、液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 (LC-Q-ToF/MS) を用いた。LC 装置は LC-20ADXR システム (島津製作所)、カラムは Scherzo SM-C18 (粒子径 3  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  10 mm i.d., インタクト) を用いた。移動相 A 液: 0.3% ギ酸, B 液: 1% ギ酸アセトニトリル, カラム温度: 45 °C, 流速: 0.18 mL/min で測定した。B 液比率は 0% (0 ~ 10 分), 0 ~ 100% (10 ~ 15 分), 100% (15 ~ 25 分), 0% (25 ~ 35 分) とするグラジエント条件で実施した。MS 装置は micrOTOFQ II (ブルカージャパン) を用いた。イオン化法: ESI, 測定範囲:  $m/z$  50-1000, 乾燥ガス: 窒素 (7 L/min, 180 °C), ネブライザーガス: 窒素 (1.6 bar), キャピラリー電圧: ポジティブモードでは 4500 V, ネガティブモードでは 2800 V とした。オートサンプラーは 4 °C に保持し、注入量は 5  $\mu$ L とした。

## 4. 培養細胞におけるイチジク茶の脱顆粒抑制効果

ヒューマンサイエンス研究資源バンク (公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) から購入したラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 (JCRB0023) を用い、

5%CO<sub>2</sub>, 37 °C で培養した。脱顆粒抑制作用は、 $\beta$ -ヘキササミニダーゼ ( $\beta$ -Hex) 量を指標とした。細胞を  $4.0 \times 10^5$  cells となるよう透明平底 24 穴プレート (CAT. No. 92024, TPP) に播種し、マウスモノクローナル抗 DNP-IgE 抗体を 0.45  $\mu$ g/mL となるよう添加した。その後、被験物質を培地の 1/10 量添加し、24 時間培養した。対照区にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を添加した。細胞を PBS で洗浄し、siraganian 緩衝液 (NaCl 119 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.4 mM, PIPES 25 mM, NaOH 40 mM, Glucose 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, ウシ血清アルブミン 0.1%) で再懸濁した後、DNP-BSA 抗原を 0.1  $\mu$ g/mL となるよう添加し、37 °C で 30 分間インキュベートして脱顆粒を誘起させた。上清 50  $\mu$ L を透明平底 96 穴プレート (CAT.No. 167008, Thermo) に回収し、 $\beta$ -Hex の反応基質である 1 mM *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニド溶液 (pH 4.5, 0.1 M クエン酸緩衝液に溶解) を 50  $\mu$ L 添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。その後、2 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) を 100  $\mu$ L 加えて酵素反応の停止と呈色反応を行い、405 nm の吸光度をプレートリーダー (SYNERGY HTX, BioTek) で測定した。 $\beta$ -Hex 放出率は、次式から算出した。

$\beta$ -Hex 放出率 (%) =

$$\frac{\text{試料添加区 } \beta\text{-Hex 量} - \text{自然放出 } \beta\text{-Hex 量}}{\text{対照区 } \beta\text{-Hex 量} - \text{自然放出 } \beta\text{-Hex 量}} \times 100$$

## 5. 統計処理

全ての試験は 3 回試行し、平均値および標準偏差で示した。統計処理には、4steps エクセル統計アドインソフト Statcel3 (オーエムエス出版) を用いた。3 試験区以上の比較では、多重比較検定の Dunnett 法 (脱顆粒抑制効果の検討では Tukey-Kramer 法), 2 試験区の比較では、Student's *t* 検定を用いた。 $p < 0.05$  で有意差ありと判定した。

## 結果

### 1. イチジク茶における浸出温度とフロクマリン溶出量の関係

イチジク茶葉を 0.1 ~ 20 °C で 120 分間浸出したときのフロクマリン溶出量を図 1 に示した。プソラレンおよびベルガプテンは、浸出温度が低いほど溶出量は低下し、0.1 °C における溶出量 (熱水浸出との相対値) は、プソラレンが 69.1%, ベルガプテンが 42.4% であった。0.1 °C で 120 分間浸出したときのフロクマリン濃度は、プソラレンが  $17.0 \pm 0.8$   $\mu$ g/mL, ベルガプテンが  $2.6 \pm 0.2$   $\mu$ g/mL であった。0.1 ~ 20 °C で 120 分間浸出したときの非フロ

クマリン成分の溶出量を図2に示した. いずれも10℃までは温度に依存して増加したが, 20℃では減少した. 特にQ3MGとルチンでは, 20℃で大幅に減少した. 熱水

浸出と0.1℃, 120分間で浸出したときのクロマトグラムを図3に示した. フロクマリン以外のピークでは, 熱水浸出と大きな差はなかった.

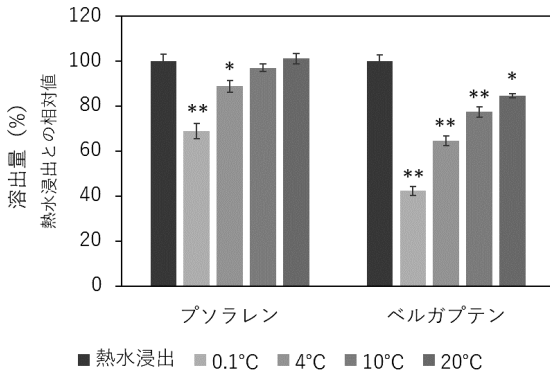


図1 イチジク茶の浸出温度とフロクマリン溶出量の関係

熱水浸出 (80℃, 3分間) を100とした場合の相対値  
120分間浸出したときの結果を示している.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs 熱水浸出

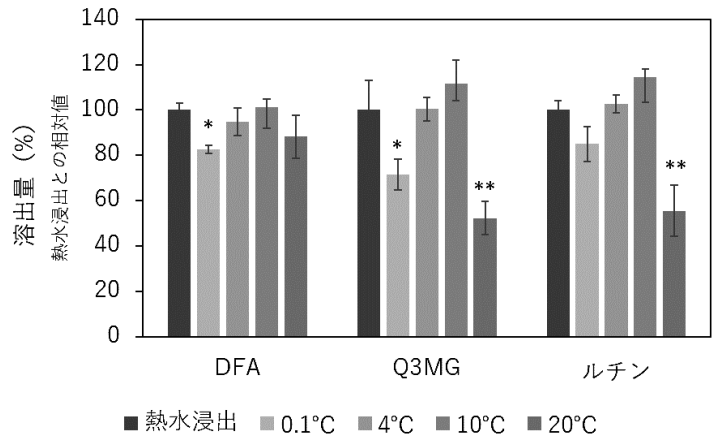


図2 イチジク茶の浸出温度と非フロクマリン成分溶出量の関係

熱水浸出 (80℃, 3分間) を100とした場合の相対値  
120分間浸出したときの結果を示している.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs 熱水浸出

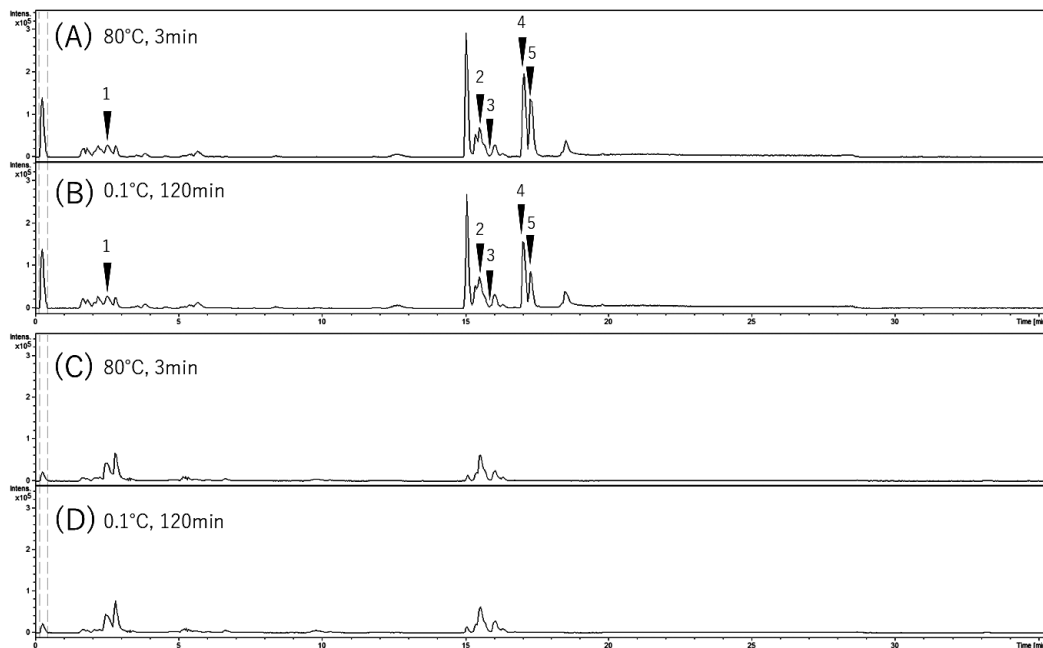


図3 各浸出条件における浸出液のクロマトグラム

BPC(Base Peak Chromatogram) を示している. (A)(B) はポジティブイオンモード,  
(C)(D) はネガティブイオンモードを示している.

1:DFA, 2: ルチン, 3:Q3MG, 4: プソラレン, 5: ベルガプテン

2. イチジク茶における浸出時間とフロクマリン溶出量の関係

0.1℃で1~24時間浸出した時のフロクマリン溶出量を測定した結果を図4に示した。プロソラレンおよびベルガプテンは、浸出開始1時間と比べて3時間では1.2~1.5倍に溶出量が増加し、その後24時間まで大きな変動はなかった。次に、非フロクマリン成分が十分に浸出される時間(最低浸出時間)を検討した。0.1℃で10~120分間浸出した時の結果を図5に示した。結果、Q3MGおよびルチンは浸出開始から50分で最高値(147%, 137%)となり、熱水浸出時より多くなった。その後120分では減少した。DFAは大きな変動はなかったが、浸出開始から30分で最高値(93%)となった。

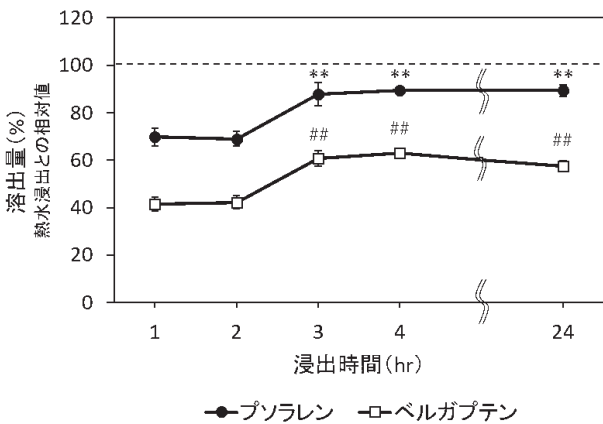


図4 イチジク茶の浸出時間とフロクマリン溶出量の関係  
熱水浸出(80℃, 3分間)を100とした場合の相対値  
0.1℃で浸出したときの結果を示している。  
\*\*:  $p < 0.01$  vs 0.1℃, 1hr (プロソラレン)  
#:  $p < 0.01$  vs 0.1℃, 1hr (ベルガプテン)

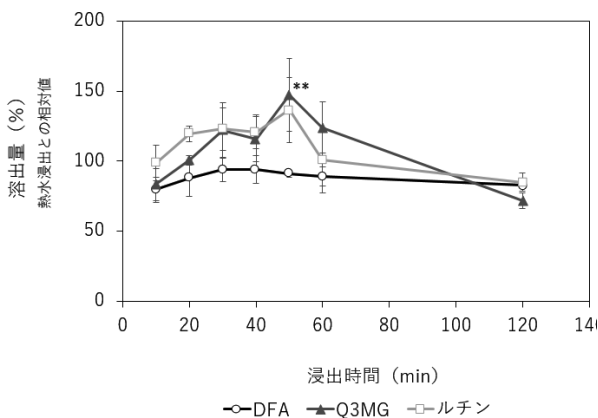


図5 低温浸出時の非フロクマリン成分の溶出用  
熱水浸出(80℃, 3分間)を100とした場合の相対値  
0.1℃で浸出したときの結果を示している。  
\*\*:  $p < 0.01$  vs 0.1℃, 10min

3. フロクマリンを低減した茶液の脱顆粒抑制効果

低温浸出(0.1℃, 120分間)した茶液の脱顆粒抑制効果を評価した結果、熱水浸出(80℃, 3分間)と効果に差はなかった(図6)。

4. トウキ葉茶における浸出条件とフロクマリン溶出量の関係

トウキ葉茶に含まれるキサントトキシンとベルガプテンの熱水浸出(80℃, 3分間)および低温浸出(0.1℃, 120分間)における溶出量を測定した(図7)。キサントトキシンおよびベルガプテンは、低温浸出によって溶出量が減少し、熱水浸出時との相対値は、キサントトキシンが39.7%, ベルガプテンが29.7%であった。

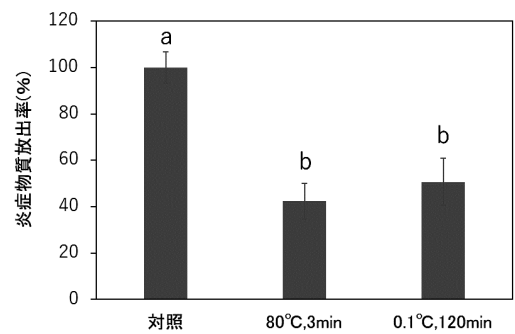


図6 フロクマリンを低減・除去したイチジク茶の脱顆粒抑制効果  
対照区(PBS添加)の炎症物質放出率を100と場合の相対値異なるアルファベットは $p < 0.05$ の有意差を示している。

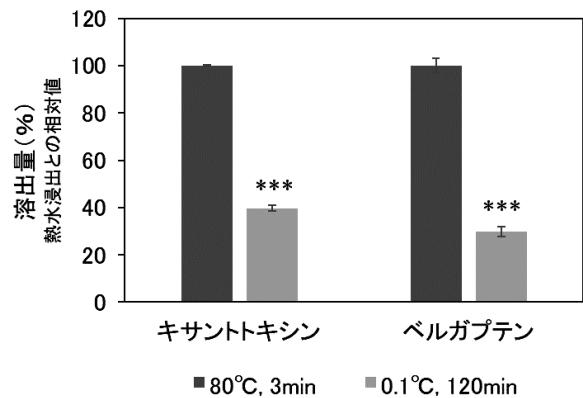


図7 各浸出条件におけるトウキ葉茶のフロクマリン含量  
熱水浸出(80℃, 3分間)を100とした場合の相対値  
\*\*\*:  $p < 0.001$  vs 80℃, 3min

## 考察

イチジク茶のフロクマリン低減方法として、0.1 ~ 20 °Cの冷水を用いる低温浸出を検討した。熱水浸出(80 °C, 3分間)のフロクマリン量と比較した結果、浸出温度が低いほどフロクマリン溶出量は低減した。0.1 °Cの浸出でフロクマリン溶出量は最も少なく、プソラレンとベルガプテンの総量として36%低減した。特にベルガプテンで効果が高く、単独では最大58%低減した。最適な浸出時間を検討したところ、0.1 °C, 120分間以内で最もフロクマリンの溶出が低減した。熱水浸出と低温浸出のクロマトグラムを比較したところ、フロクマリン以外の成分はほとんど差がなく、低温であっても溶出されることを確認した。また、0.1 °C, 120分で浸出した茶液の脱顆粒抑制効果は、熱水浸出時と差はなく、低温浸出時にも機能性は維持された。

プソラレンやベルガプテンは低極性化合物であり、水への溶解性は低いが、低温にすることで、さらに溶出が抑制されたと考えられた。ベルガプテンはプソラレンの5位にメトキシ基が結合した化合物で、分子量はプソラレンより30大きい。分子量の大きさも水への溶解性に関与しており、その他の構造が同じ場合は、分子量が大きいほど水への溶解性が低くなることから、ベルガプテンはプソラレンより溶出抑制されたと推察された。Q3MG, ルチンおよびDFAの非フロクマリン成分は低温浸出においても、熱水浸出時と同等の溶出が認められた。Q3MGやルチンはケルセチン配糖体であり、配糖体は水溶性が高くなることから、低温においても溶出されやすかったと推察された。

イチジク茶のフロクマリンは、浸出開始から120分以降で溶出量が増加した。緑茶のカフェインは低温浸出で溶出しにくくなるが、低温であっても徐々に溶出することが報告されており、福司山らは7 ~ 8 °Cの2時間浸出では22.4 ~ 49.6%, 10時間浸出では40.8 ~ 75.1%が茶葉から溶出されると報告している<sup>12,13)</sup>。茶生葉のカフェインは、短時間で急激に溶出する性質があり、その理由は明らかではないが、組織におけるカフェインの局在や膜透過性が関与していると考えられている<sup>15)</sup>。カフェインとプソラレン、ベルガプテンの化学構造における共通点は多くないが、低温かつ長時間における溶出が似ていることから、局在や膜透過性が類似している可能性が示唆された。

今回、0.1 °Cの低温浸出によって、プソラレン量は24.7 µg/mLから17.4 µg/mL、ベルガプテン量は6.2 µg/mLから2.6 µg/mLに低減された。イチジク茶の1回当たりの摂取量を200 mLとすると、プソラレン3.4 mg、ベルガプテン0.5 mg、合計3.9 mgを摂取することになる。Schlatteerらは、キサントトキシンおよびベルガプテン混合物を用いて、ヒトにおける光毒性作用を検討した結果、キサントトキシンとして15 mg/回以上の経口摂取で光毒性を生じる可能性があるとして報告している<sup>9)</sup>。プソラレン

とベルガプテンの光毒性作用の強さがキサントトキシンと同等と仮定すると、上記の摂取量では光毒性リスクは低いと考えられた。

フロクマリン含有茶であるトウキ葉茶を用いて、同様に低温浸出を実施したところ、キサントトキシンとベルガプテンの溶出量は、熱水浸出時の半量以下であった。本方法は、イチジク茶に限らず、他のフロクマリン含有食品でも有用であることが示唆された。トウキ以外のセリ科の漢方素材には、ビャクシやボウフウ等があり、これらにはアンゲリシンやキサントトキシン等のフロクマリンが含まれている<sup>6)</sup>。これらの乾燥粉末から抽出物を調製する際にも、抽出温度や時間を変化させることで、フロクマリン溶出量を調節できると考えられた。

以上の結果から、フロクマリンを含む茶葉等の食品は、低温浸出することでフロクマリンの溶出量を抑制できることが明らかとなった。

## 参考文献

- 1) Abe T. : Fig (*Ficus carica* L.) leaf tea suppresses allergy by acceleration disassembly of IgE-receptor complexes. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **84**, 1013-1022 (2020).
- 2) Takahashi T., Okiura A., Saito K., Kohno M. : Identification of phenylpropanoids in fig (*Ficus carica* L.) leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 10076-10083 (2014).
- 3) Melough M. M., Lee S. G., Cho E., Kim K., Provatas A. A., Perkins C., Park M. K., Qureshi A., Chun O. K. : Identification and Quantitation of Furocoumarins in Popularly Consumed Foods in the U.S. Using QuEChERS Extraction Coupled with UPLC-MS/MS Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 5049-5055 (2017).
- 4) 齋田 哲也, 藤戸 博 : 酵素免疫測定法による食物・生薬中のフラノクマリン類含量のスクリーニング. *医療薬学*, **32**, 693-699 (2006).
- 5) 姉帯 正樹, 増田 隆広, 高杉 光雄, 柴田敏郎, 畠山好雄 : 当帰の調製法と化学的品質評価 (第5報) 調製過程におけるストレス化合物の産生. *北海道立衛生研究所報*, **52**, 12-18 (2002).
- 6) Terato M., Ishikawa A., Yamada K., Ozeki Y., Kitamura Y. : Increased furanocoumarin production by *Glehnia littoralis* roots induced via *Agrobacterium rhizogenes* infection. *Plant Biotechnol.*, **28**, 317-321 (2011).
- 7) 磯村 明, 永井 正博, 石館 八重子, 井上 隆夫, 柳浦 才三 : イチジク葉の血圧下降成分. *生薬学雑誌*, **29**, 147-151 (1975).

- 8) 島本暉朗, 高島弘道: 化粧品研究と接触性皮膚炎. 日本化粧品技術者会誌, **14**, 5-12 (1980).
- 9) Schlatter J., Zimmerli B., Dick R., Panizzon R., Schlatter C. : Dietary intake and risk assessment of phototoxic furocoumarins in humans. *Food Chem Toxicol.*, **29**, 523-530 (1991).
- 10) Lim G. E., Li T., Buttar H. S. : Interactions of grapefruit juice and cardiovascular medications: A potential risk of toxicity. *Exp. Clin. Cardiol.*, **8**, 99-107 (2003).
- 11) Paine M. F., Widmer W. W., Hart H. L., Pusek S. N., Beavers K. L., Criss A. B., Brown S. S., Thomas B. F., Watkins P. B. : A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *Am. J. Clin.*, **83**, 1097-1105 (2006).
- 12) 堀江 秀樹, 氏原 ともみ, 木幡 勝則: 茶主要成分の茶浸出液への溶出特性. 茶業研究報告, **91**, 29-33 (2001).
- 13) 福司山 エツ子, 徳田 和子, 武弓 利雄, 佐波 哲次: 水だし煎茶における浸出時間と嗜好性および溶出成分量との関係. 日本家政学会誌, **50**, 63-68 (1999).
- 14) 北野 文理, 永澤 健: 大和当帰茶のフタライド類およびフロクマリン類の含有量. 微量栄養素研究, **34**, 43-46 (2017).
- 15) 津志田 藤二郎, 村井 敏信: 茶葉に存在するカフェインの熱湯による特異的溶出. 日本農芸化学会誌, **59**, 917-919 (1985).