

イチジク葉の抗酸化能とその関与成分について

高橋 徹*, 齋藤 圭太**, 目代 貴之**, 河野 雅弘**

Antioxidant Capacity and Related Compounds of Fig Leaf

Toru Takahashi*, Keita Saito**, Takayuki Mokudai** and Masahiro Kohno**

Fig (*Ficus carica* L.) is one of the most ancient cultivated fruit trees. Despite that the fig leaves often had been used for Chinese medicine or folk medicine, sufficient research has not been carried out on function and functional compound in fig leaf. In this study, the antioxidant capacity and some related compounds were investigated in the leaf of fig for 40 varieties.

Mature leaves in the center of the shoot, were harvested from middle to late august in our research farm. Leaves were homogenated with water, and the supernatant was filtered by 0.45 μm syringe filter. This water extract was used for analysis. Superoxide dismutase (SOD)-like activity was measured, as antioxidant capacity, by ESR spin-trapping method. Among 40 fig varieties, SOD-like activity of leaf water extract was varied from 521 to 1182 U/gFW (average 899 U/gFW). 'Masui Dauphine', the most dominant variety in Japan, had low activity (532 U/gFW). 11 varieties showed over 2 times higher SOD-like activity than 'Masui Dauphine'. Vitamin C was not detected in water extract. On the other hand, in the metaphosphoric acid solution extract, vitamin C was detected. Total polyphenol content in water extract had positive correlation with SOD-like activity ($r=0.87$). Rutin was identified in water extract of leaf by LC-MS analysis. Other HPLC peak fraction showed SOD-like activity. Therefore, it was found that fig leaf contains vitamin C and some polyphenols, include rutin, as antioxidant agent.

Key words : fig, leaf, antioxidant, SOD-like activity, polyphenol

イチジク (*Ficus carica* L.) はアラビア南部を原産とするクワ科の植物で、リングヤブドウなどと共に最古の栽培果樹の一つといわれている¹⁻²⁾。イチジクは果実を食べるだけでなく、枝・葉・根なども含めて漢方薬や民間療法にも利用されてきた。最古の文明といわれる紀元前 3000年頃のシュメール文明（メソポタミア地方：現在のイラク周辺）において、既にナツメヤシやシナモン等と共に薬用に利用されていた事が知られている（用いられたのは主に枝・根・樹皮・樹液などであった）³⁻⁴⁾。葉に関しては煎じ薬やすりつぶした汁は食中毒薬や駆虫剤、あるいは痔の治療薬になるとされている⁵⁻⁶⁾。しかしその利用は果実と比べるとわずかであり、さらに効能のメカニズムなども十分に研究されているとは言えない。そこで、イチジク葉が持つ機能性とその関与成分を明らかにすることを目的として研究を開始した。

機能性の指標として、近年注目されている抗酸化能に着目した。抗酸化能の測定方法は種々あるが、我々は生体内で最も頻繁に生成され、酸化ストレス反応の出発点とも言えるスーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) の消去能を調べることにした。本件では 40品種のイチジクを対象

に、葉の抗酸化能について品種間差や関与成分を調査した結果を報告する。なお本研究は東北大学、未来科学技術共同研究センター、河野研究室との共同研究である。

材料および方法

1. 材料

付属農場にて栽培している 40品種を供試した。2006年 8 月中～下旬に、当年枝（新梢）中位に着生する成葉を採取した。水で洗浄した葉を約 2 cm 角に細切して縮分し、 -80°C で保存した。葉を 9 倍量の水と共にホモジナイズし、その上清を 0.45 μm メンブランフィルターで濾過して水抽出液を調製し分析試料とした。

2. 抗酸化能の測定

水抽出液を試料として、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 消去能を ESR スピントラップ法で測定した。試料液は全て 1/10 希釈で測定に供した。ESR 装置は JES-FA100（日本電子）を用い、測定条件は以下の通りとした、マイクロ波出力：4 mW、磁場掃引幅：330.5-340.5 mT、磁場変調：100 kHz・0.07 mT、掃引時間：2 min、応答時間：0.1 sec。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ はヒポキサンチン／キサンチンオキシダ

ーゼ系で発生させ、DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide) をスピントラップ剤としてスピニアダクトのシグナルを検出した。測定は二反復で行った。O₂⁻消去能はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 標品酵素を用いて作成した検量線から、SOD様活性 (Units) に換算した。

3. 抗酸化成分の測定

(1) ビタミンC含量

水抽出液, あるいは4%メタリン酸抽出液を試料としてHPLCで測定した。HPLC装置はLC-3A (島津) およびLC-10A (島津) を用いた。カラムはAsahipak NH2P-50 4E (Shodex: 粒子径5 μm, サイズ 250 mm×4.6 mm i.d.) を用い, 移動相にはリン酸緩衝液 (pH 2.2) / アセトニトリル=1/4を使用した。カラム温度 35℃, 移動相流速 1 ml/minとし, 254 nmの吸光度でL-アスコルビン酸を検出した。測定は二反復で行った。

(2) 総ポリフェノール含量

水抽出液を試料として, Folin-Ciocalteu法で測定した。試料液に同量の 0.1N Folin-Ciocalteu試薬を加え, 3分後に試料液と同量の10%炭酸ナトリウム水溶液を添加して1時間室温で放置した後, 700 nmの吸光度を測定した。結果は没食子酸・一水和物で作成した検量線を用いて, 没食子酸当量に換算した。測定は三反復で行った。試料液にビタミンCが含まれる場合は, その分の吸光度を控除して含量換算を行った。

(3) ポリフェノールのLC-MS分析

水抽出液を試料とした。除タンパクのために二倍量のメタノールを加え, 0.45 μmメンブレンフィルターで濾過し

たものを分析した。分析方法はKammererら⁷⁾の方法に準じた。HPLC装置は1100システム (Agilent), カラムはAQUA-C18 (Phenomenex: 粒子径5 μm, サイズ 250 mm×4.6 mm i.d.) を用いた。カラム温度は 30℃, 移動相はA液: 2%酢酸, B液: 0.5%酢酸/アセトニトリル=1/1を使用し, 流速 1 ml/minで, B液比率を分析開始時 (10%), 20分 (24%), 40分 (30%), 60分 (55%), 75分~83分 (100%), 85~90分 (10%) とするグラジエント条件で分析した。ポリフェノール類の検出はフォトダイオードアレイを用いて, 波長 250, 280, 320, 370 nmの吸光度で行った。質量分析は検出器 (MSD) にG1946D型 (Agilent) を使用し, 以下の条件で分析した, イオン化法: エレクトロスプレー, 測定質量範囲: m/z 50~1000, フラグメンター電圧: 150 V, キャピラリー電圧: 3500 V, ネブライザーガス: N₂ (60 psi), 乾燥ガス: N₂ (12 L/min, 350℃), 測定イオン: 負イオン。分析は二反復で行い, ルチンを外部標準として測定し補正した。

結果および考察

1. 成葉水抽出液のSOD様活性

40品種の成葉の水抽出液を対象に調べたSOD様活性を図1に示した。SOD様活性は最も低い‘早生ドーフィン’の 521 U/gFWから最も高い‘グリーズ・ビール’の 1182 U/gFWまでの範囲で分散しており, 明確なグループ分けは見られなかった。平均は 899 U/gFWで, これは同様の方法で測定された葉菜類より高く, シソ (700 U/gFW) と同等以上のレベルであった⁸⁾。国内の主

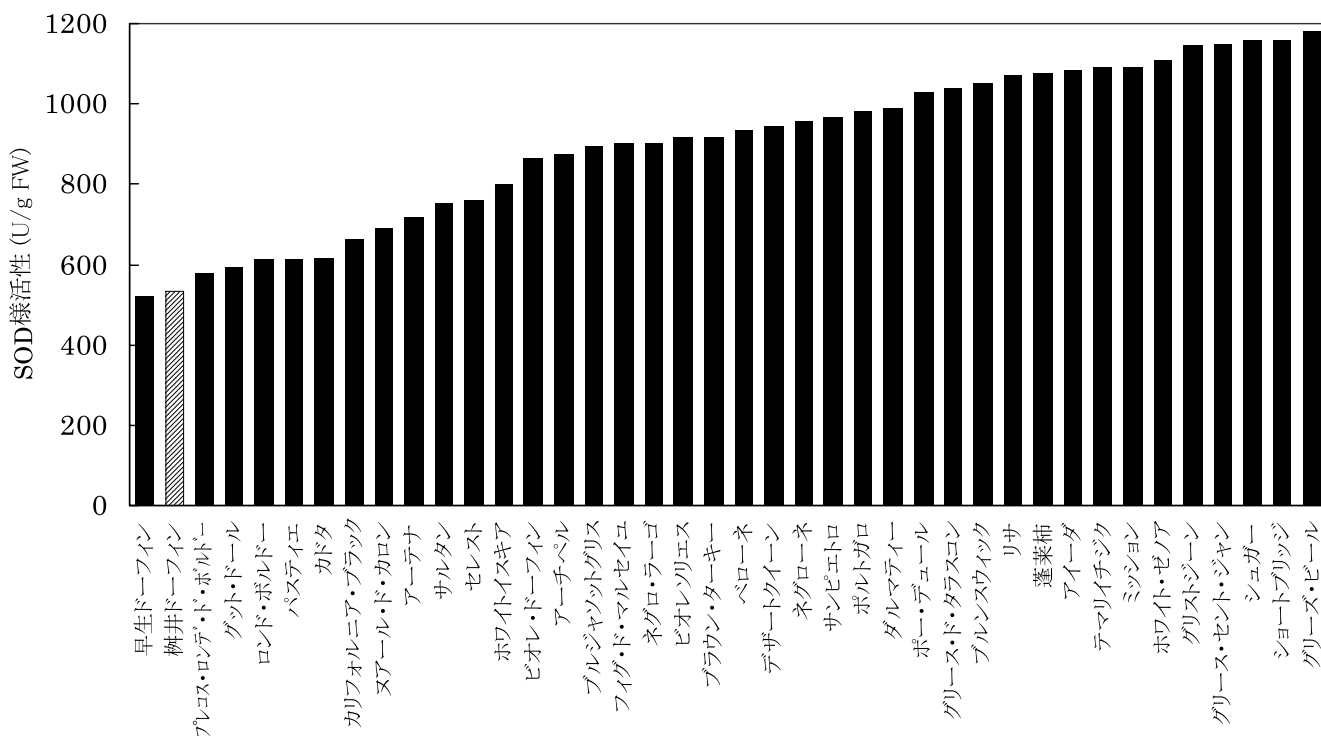


図1 イチジク成葉水抽出液のSOD様活性

要品種で、作付けの 70%程を占めるとされる‘榊井ドーフィン’のSOD様活性は調べた中ではかなり低かった。一方、‘榊井ドーフィン’に次いで国内で多く栽培されている‘蓬萊柿’を含む上位11品種は、‘榊井ドーフィン’の二倍以上の活性を示した。イチジク葉を乾燥・焙煎等で加工したイチジク茶が販売されているが、その原料の多くは‘榊井ドーフィン’である可能性が高い。今回の結果から、‘榊井ドーフィン’を用いた従来品よりもSOD様活性が高いイチジク茶を作ること、品種の選択によって可能であると考えられる。

水抽出液のSOD様活性と葉や樹の形態的特性との間に

関連があるかどうかを検討した。イチジク葉の形態は品種によって大きく異なり、品種特性の重要な要素である。そこで、葉の形態をタイプ分けし(図2)、SOD様活性との関連を調べた。その結果、葉の形態とSOD様活性の間には明確な関連性は見いだせなかった(表1)。一方、樹姿(開張性～中間～直立性)では枝振りが直立性の品種群の方がSOD様活性は高い傾向が見られた(表2)。樹姿は栽培の方法・環境によって変動することが考えられるため、今回の結果だけで断定はできないが、葉の抗酸化能に着目して品種を選定あるいは育種する際には検討項目となる可能性がある。

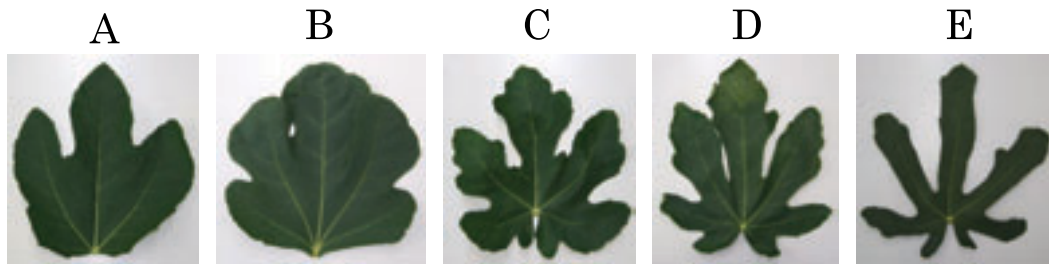


図2 共試したイチジク成葉の葉形のタイプ分け

A (蓬萊柿), B (シュガー), C (榊井ドーフィン), D (ベローネ), E (ダルマティー)

表1 葉形タイプ別*で比較したイチジク成葉水抽出液のSOD様活性および総ポリフェノール含量 (平均値±標準偏差)

葉形 タイプ	n	SOD様活性 (U/gFW)	総ポリフェノール含量 (mg/100gFW)
A	1	1076	700
B	9	856±211	485±120
C	20	918±216	504±116
D	5	904±107	509±97
E	5	862±217	475±122

* 図2 参照

表2 樹姿別*で比較したイチジク成葉水抽出液のSOD様活性および総ポリフェノール含量 (平均値±標準偏差)

樹姿	n	SOD様活性 (U/gFW)	総ポリフェノール含量 (mg/100gFW)
開張性	18	845±201	481±114
中間	7	846±125	444±79
直立性	15	989±202	553±114

* 農林水産省 植物種類別特性審査基準(イチジク)に準じた

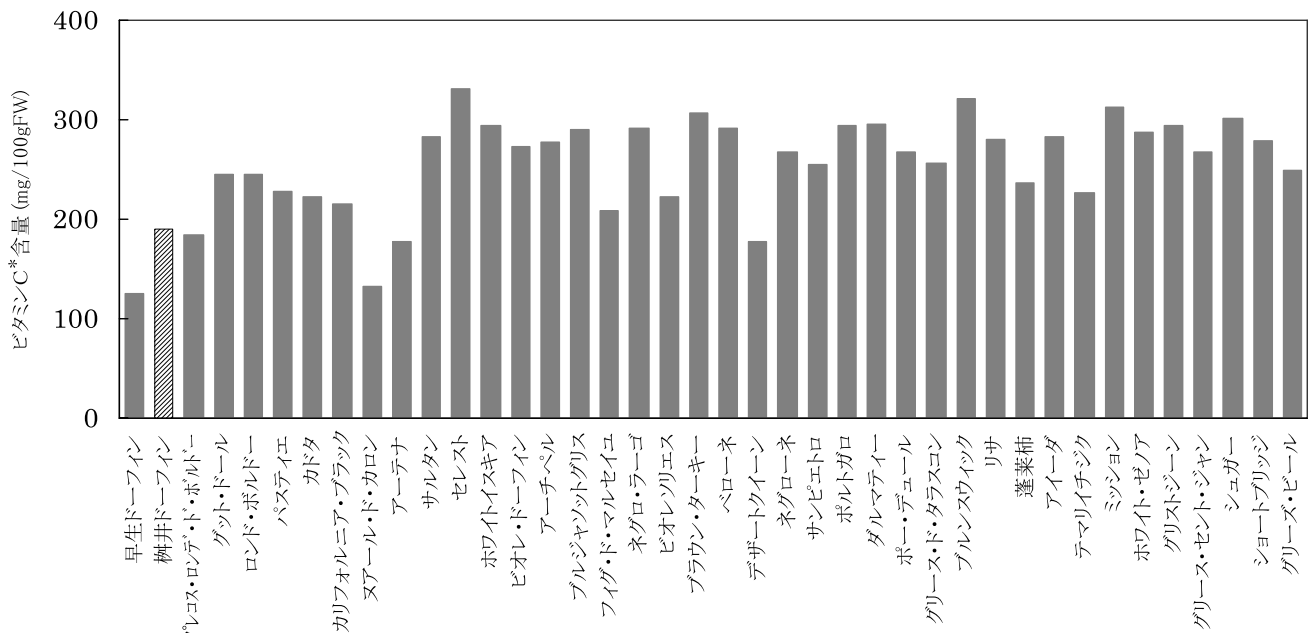


図3 イチジク成葉メタリン酸抽出液のビタミンC含量
*L-アスコルビン酸等量

2. 成葉水抽出液の抗酸化成分

(1) ビタミンC含量

ビタミンCは多くの植物に含まれ、水溶性の低分子化合物の中で最も強い抗酸化成分の一つである⁹⁻¹⁰⁾が、水抽出液からはビタミンCは検出されなかった。メタリン酸水溶液で抽出を行い測定したところ、125~331 mg/100gFW (平均 255 mg/100gFW) のビタミンCが検出された(図3)。ビタミンC量を成分表¹¹⁾に記載された野菜類と比較すると、葉菜類では最も多い芽キャベツ (160 mg/100gFW) や、野菜で最も多いトマピー (パプリカの一種: 200 mg/100gFW) と同等以上の品種が多かった。葉の利用形態によってはビタミンCもSOD様活性成分として利用できるものと考えられる。水抽出液でビタミンCが検出されなかった原因としては、pH調整や有機溶媒添加を行っていないため、酵素により分解された事が考えられる。

(2) 総ポリフェノール含量

水抽出液で調べたイチジク葉の総ポリフェノール含量を図4に示した。総ポリフェノール含量は40品種間で 258~634 mg/100gFW (平均 447 mg/100gFW) のばらつきがあり、SOD様活性と正の相関 ($r=0.87$ /危険率5%) を示した。植物葉の総ポリフェノール含量に関して、高橋ら¹²⁾は各種野菜・果樹の葉を凍結乾燥して 80%メタノールで抽出した結果を報告している。そのデータではイチジク葉の総ポリフェノール含量は 16.3 mg/gDWで、クリの葉 (71.1 mg/gDW) やビワの葉 (54.4 mg/gDW) と比べて

低いことが示されている。イチジク葉の水分含量は 75%前後であったことから、新鮮重量当りに換算すると 400 mg/100gFW程度となる。品種は明記されていないが‘榊井ドーフィン’であるとする、我々の‘榊井ドーフィン’の測定値は 326 mg/100gFWでやや低い値となる。この差は抽出溶媒の違いによるものと考えられる。また我々が調べた中で最も多い品種でも‘榊井ドーフィン’の二倍程度であったことから、イチジク葉は他の果樹葉と比べてポリフェノール含量が特別多くはないと推察される。今回はイチジク葉をそのまま、あるいは青汁の様な形態で喫食することを想定し、水を抽出溶媒として用いた。しかしポリフェノールには水溶性が低い物もあるため、今後はアルコールを用いた抽出も検討する予定である。

水抽出液にはビタミンCが含まれなかった事から、今回測定されたSOD様活性にはこのポリフェノールが大きく寄与しているものと推定される。ポリフェノールは抗酸化成分とされているが、そのラジカル消去活性の強さは構造により大きく異なる¹³⁾。また、測定に用いたFolin-Ciocalteu法は多数の検体について大まかに総量を把握するには適しているが、ポリフェノールだけではなく、還元力のある物質を全て検出してしまうという欠点もある¹⁴⁾。従って、ポリフェノールが関与しているイチジク葉の抗酸化能を解明あるいは評価するには、総量だけでなくその組成を知ることが必要となる。

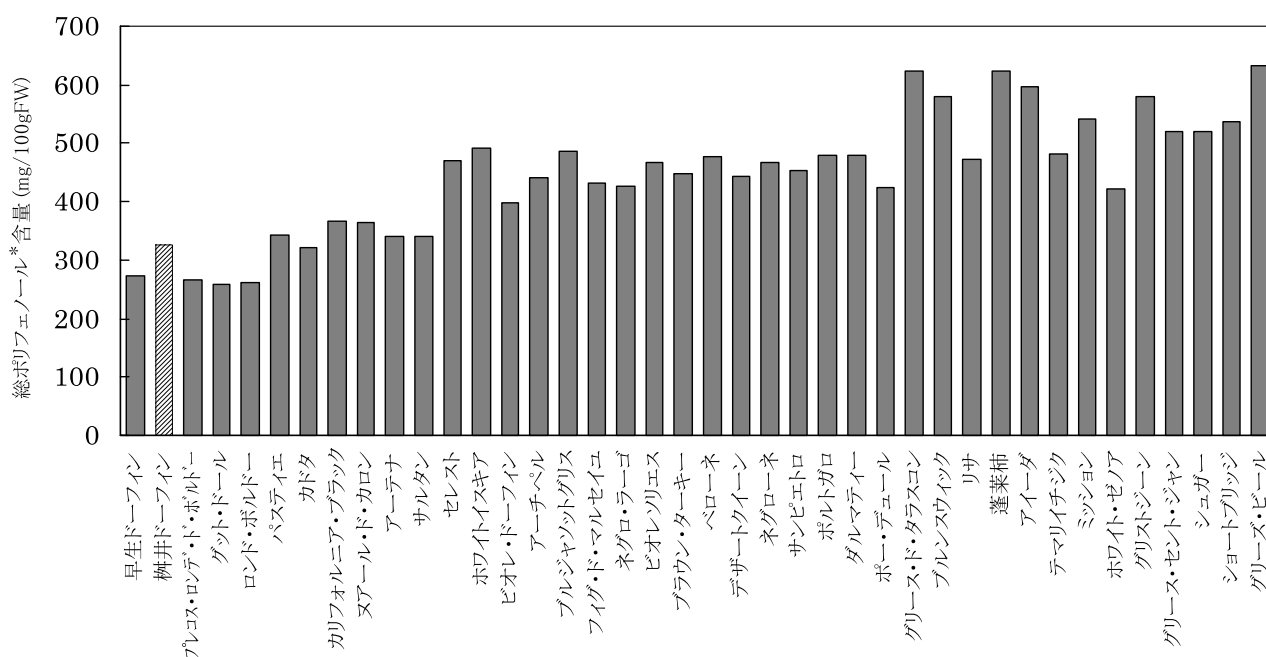


図4 イチジク成葉水抽出液の総ポリフェノール含量
*没食子酸等量

3. イチジク葉ポリフェノールの分析

(1) LC-MS分析結果

イチジク葉の水抽出液をLC-MSで分析した結果、紫外部 (250~370 nm) に吸収を持つ、ポリフェノール類と考えられる複数のピークが検出された。そのクロマトグラムの一例を図5に示した。これらのピークは、面積値は品種によって異なったが、ほとんどの品種で共通して観測された。各ピークについて、これまでに分析したポリフェノール類のデータと比較したところ、ピーク3はリテンションタイムおよびMSフラグメントが一致したことから、ルチンであると同定した。ルチンはフラボノイドの一種であるケルセチンの配糖体で、ソバの主要ポリフェノールとして、またイチジク葉にも含まれることが既に知られている¹⁵⁾。ビタミンC¹⁶⁻¹⁷⁾ほど強力ではないが $O_2^{\cdot-}$ 消去能があり¹³⁾、血管の強化や弾力性維持・血液の流動性改善¹⁸⁻¹⁹⁾、などの生理機能が報告されている。ピーク5および6は、それぞれフラノクマリン類のプロソラレンおよびベルガブテンであった。両者ともエレクトロスプレー法ではMSフラグメントが得られなかったため、リテンションタイムおよび紫外外部吸光特性の一致により同定した。これらフラノクマリンには光感作作用があり、皮膚についた状態で紫外線を浴びると皮膚炎を引き起こす事がある²⁰⁾。プロソラレン、ベルガブテンともにセリ科の野菜にも含まれており²¹⁻²²⁾、摂取しても危害を示すことはほとんどないと考えられるが、利用する場合にはこれらの濃度に注意するとともに、可能な限り濃度を低減させる方法を検討するべきである。

その他のピークは今のところ未同定であるが、ピーク1のMSフラグメントにはカフェ酸と同じパターンが含まれていた。両者のリテンションタイムは全く異なるが(カフェ酸のリテンションタイムは22分であった)、ピーク1の構造にはカフェ酸が含まれているものと推察される。イチジク葉のポリフェノールに関してはほとんど報告がないが、Vayaら²³⁾は、イチジク葉のメタノール抽出液を分析した結果、酸加水分解した試料ではケルセチンとルテオリンを検出したが、加水分解していない試料ではこれらアグリコンのポリフェノールはわずかししか検出されなかった、と報告している。我々の分析でもケルセチンの配糖体であるルチンは検出されたが、アグリコンのケルセチンやルテオリンは検出されなかったことから、イチジク葉ポリフェノールはほとんどが配糖体として存在しているものと推定される。

(2) ピーク成分と抗酸化能

LC-MS分析で得られたピークの面積値は品種によって異なり、ポリフェノールの組成比には品種間差のあることが分かった。そこで、ピーク面積値とSOD様活性との相関関係を調べたところ、ピーク1は明確な正の相関を示した(図6)。ピーク1はSOD様活性の低いグループではほとんど検出されなかったこと、各成分の実際の濃度が不明であること、ポリフェノールは構造によって活性の強さが大きく異なること¹³⁾、などから、その他にも活性を持つピークが関与している事は十分に考えられる。そこで各ピーク

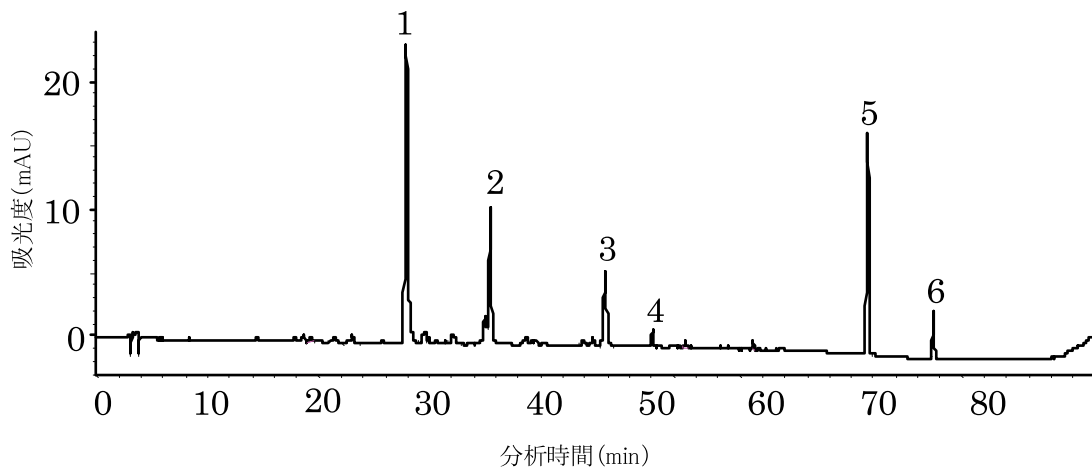


図5 ‘ショート・ブリッジ’ 成葉水抽出液のHPLCクロマトグラム (DAD: 320 nm)

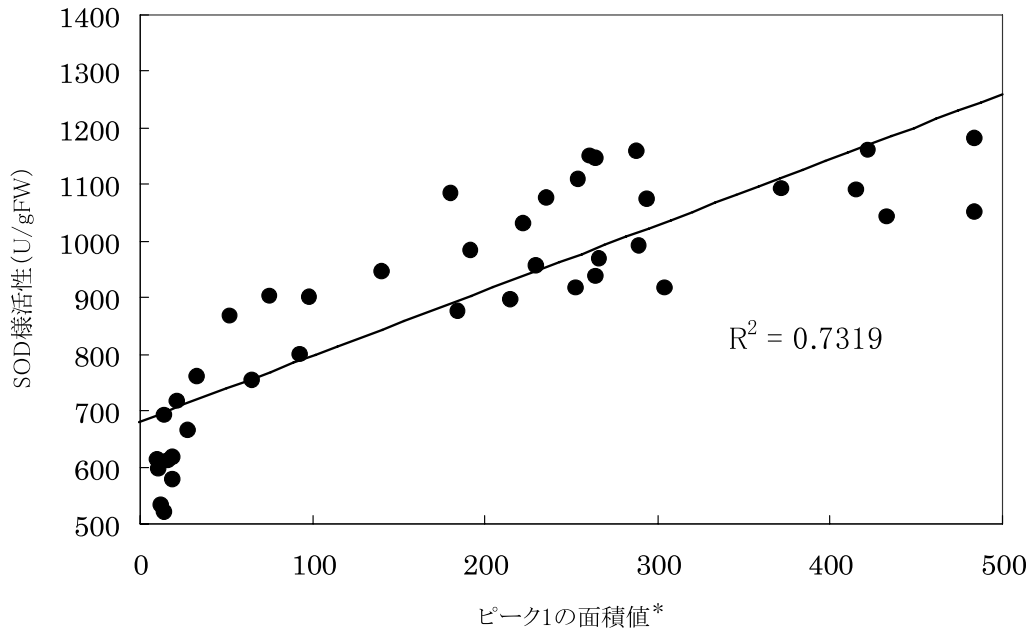


図6 イチジク成葉水抽出液におけるピーク1の面積値とSOD様活性との関係
*320 nmにおける測定値

クの画分を採取し、SOD様活性の測定を試みた。その結果、ピーク1では明確な活性が確認できたが、ルチンを含むその他のピークでは活性の有無は明らかにできなかった。今回のピーク画分はサンプルロード量が少ない分析用の条件で分取したため、得られた成分量もごくわずかしがなく、そのため正確な活性が観測できなかった可能性がある。このような条件下でもピーク1はSOD様活性を示したことから、その面積値と葉水抽出液のSOD様活性との間には明確な正の相関関係が見られたことから、この成分はイチジク葉においてSOD様活性への寄与が大きいポリフェノールであると考えられる。これら未同定のポリフェノール

ールに関しては、分取用カラムを用いて各ピーク画分を十分量採取し、SOD様活性の測定とともに構造解析を行う予定である。

まとめ

当所附属農場で栽培している40品種のイチジク樹について抗酸化能およびその関与成分を調査した。成葉を8月中旬～下旬に採取し、水抽出液を調製して分析試料とした。抗酸化能はESRスピントラップ法により、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 様活性を測定した。イチジク葉水抽出液のSOD様活性は521～1182 U/gFWで、40品種

間で 2.3 倍の差があった。国内主要品種である‘榊井ドーフィン’の活性は低く、反対に上位 11 品種は‘榊井ドーフィン’の二倍以上の活性を示した。ビタミン C は水抽出液では検出されなかったが、メタリン酸溶液で抽出すると検出され、葉に含まれる事が確認された。一方、総ポリフェノール含量は SOD 様活性と正の相関がみられた。LC-MS 分析の結果、ポリフェノールの一つをルチンと同定した。HPLC ピーク画分を採取して調べた結果、ルチン以外にも SOD 様活性を示すものがあった。以上より、イチジク葉は抗酸化成分としてビタミン C およびルチンを含む幾つかのポリフェノールを含む事が分かった。今後はこれらの抗酸化成分を有効利用できる用途として茶への加工ならびにその品種特性を調査するとともに、未同定ポリフェノールの構造解析を行う。

文 献

- 1) 河瀬憲次：果樹園芸大百科13 イチジク, p5-9, 農産漁村文化協会, 東京 (2000).
- 2) 小泉龍人：東洋文化研究所紀要, 139, 207-238 (2000).
- 3) Kramer, S.N.: History Begins at Sumer, p60-64, University of Pennsylvania Press, PA, (1981).
- 4) レイ・タナヒル：美食のギャラリー, p12-18, 八坂書房, 東京 (2008).
- 5) 梁 晨千鶴：東方栄養新書, p70-71, メディカルユーコン, 京都 (2005).
- 6) 平間信彦：東洋医学研究, 98, 14-17 (2001).
- 7) Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. and Schieber, A., : *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4360-4367 (2004).
- 8) 氏家 隆：スーパーオキシド消去活性の測定法, 食品と開発, 31, 46-47 (1997).
- 9) 吉川敏一, 河野雅弘, 野原一子：活性酸素・フリーラジカルのすべて, p87-89, 丸善, 東京 (2000).
- 10) 佐藤英介, 小山敬子, 井上正康：抗酸化物質, p17-21, 学会出版センター, 東京 (1994).
- 11) 五訂増補食品成分表2006, p104-105, 女子栄養大学出版部, 東京 (2005).
- 12) 高橋 学, 樋口誠一：埼玉県産業技術総合センター研究報告, 5, 81-85 (2007).
- 13) Jovanovic, S. and Simic, M.G.: *Annals New York Academy of Sciences*, 899, 326-334 (2000).
- 14) 鈴木壯幸：食品工業, 45, 38-42 (2002).
- 15) Teixeira, D.M., Patao, R.F., Coelho, A.V. and Da Costa, C.T.: *J. Chromatography*, 1103, 22-28 (2006).
- 16) Nishikimi, N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 463-468 (1975).
- 17) 橋爪英城, 辻本恭久：日本歯科保存学雑誌, 35, 1053-1058 (1992).
- 18) 下田博司：植物ポリフェノール含有素材の開発, p96-101, シーエムシー出版, 東京 (2007).
- 19) Fengling, P., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y., Egawa, T., Kitamura, Y., Egashira, N., Iwasaki, K. and Fujiwara, M.: *J. Pharmacol. Sci.*, 104, 329-334 (2007).
- 20) 谷 守：医薬ジャーナル, 38, 2398-2405 (2002).
- 21) 指田 豊：医薬の門, 24, 220-221 (1984).
- 22) Lombaert, G.A., Siemens, K.H., Pellaers P., Mankotia M and Ng W.: *J. AOAC Int*, 84, 1135-1143 (2001).
- 23) Vaya, J. and Mahmood, S.: *Biofactors*, 23, 169-175 (2006).