

大分県産スウィートバジルの抗酸化性に関する研究 (第2報)

-抗酸化性ポリフェノール成分の検索-

山本展久*・水江智子*・佐野一成*・高野 済**・望月 聡***

*食品工業部・**㈱ファインド・ニュース・***大分大学教育福祉科学部

Study on the Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.)
Cultivated in Oita (2nd. report)

-Purification and Characterization of Antioxidative Polyphenolic Components-

Nobuhisa YAMAMOTO*・Satoko MIZUE*・Kazunari SANO*

Naru TAKANO **・Satoshi MOCHIZUKI ***

*Food Science and Technology Division・**Find News Co.,Ltd

***Faculty of Education and Welfare Science, Oita University

要 旨

大分県産スウィートバジル (*Ocimum basilicum* L.) の抗酸化性について、抗酸化活性成分の検索を目的に研究を行った。スウィートバジルのエタノール抽出液を TSKgel TOYOPEARL HW-40F に供したところ活性を有する5つのポリフェノールフラクションに分画できた。フラクションⅢ, Ⅳ, Ⅴで高い活性を示し、フラクションⅢではポリフェノール含量も多かった。各フラクションを HPLC 分析に供したところ、Ⅰ, Ⅱでは多くのピークが検出されたが、Eugenol も含まれており、フラクションⅠ, Ⅱの活性はほとんど Eugenol によるものと考察した。ピーク面積から見て、このことはスウィートバジル抗酸化性のおよそ50%が Eugenol に由来するという平成10年度の研究結果を裏付けた。また、フラクションⅢ, Ⅳ, Ⅴでは主要成分が1成分ずつ検出された。抗酸化活性、ポリフェノール量ともに高かったフラクションⅢについて、HPLCで溶出されたピークを分取し、活性を確認したところ、主要成分であるピーク1で高い活性を示した。比活性の値からピーク1はフラクションⅢの抗酸化活性の主体であることが考察された。

1. はじめに

厚生省により「成人病という表現ではなく生活習慣病が適切である」と発表されたことは記憶に新しい。日本人の三大死因と言われるガン・心疾患・脳血管疾患の発症には、遺伝的な要因に加えてライフスタイル、特に食生活が大きく影響していると考えられている。このような考えの中、食生活の改善に加え、食品中に疾病予防・自然治癒能力の増強といった機能性を求める動きも大きくなっている。「食品による疾病の予防」を目的とした機能性食品の研究プロジェクトは、日本が世界に先駆けてスタートし、現在「ファンクショナルフーズ研究」として、世界の「食と健康」研究の分野をリードしている⁽¹⁾。

こうした動きの中、我々は平成9年度の研究において、大分県内で栽培されたスウィートバジルは抗酸化性を有し⁽²⁾、野菜・果物類と比較したところ、最も強い活性を有するグループに属する(Table I)ことを確認した。抗酸化性とは生体に有害な酸化による脂質の変成を抑制する機能である。酸化による脂質の変成とは、不飽和脂肪

酸が空気中の酸素により加工・貯蔵中に自動酸化を起こし、過酸化脂質を生じることである。また、生体内でも活性酸素により同様な酸化が起こり、過酸化脂質が生成する。過酸化脂質は安定であり、生体膜ではリン脂質が酸化されることで膜構造が破壊され、様々な障害を引き起こすと言われている⁽³⁾。老化・ガン・心疾患・動脈硬化なども過酸化脂質の蓄積が原因であるとされている。

Table I 各種野菜の抗酸化活性

High Activity (~25mgBHA)	Medium Activity (25~5mgBHA)	Low Activity (5mgBHA~)
スウィートバジル	とうがらし 大根 枝豆	かぼちゃ きゅうり
春菊 みつば ショウガ	ほうれん草 ゴボウ	キャベツ かぶ ねぎ
おくら ビーマン にはら	もやし ニンニクの芽	らっきょう レタス
ミニトマト あしたば	カリフラワー 白菜 里芋	にんじん セロリ
アスパラガス パセリ	おかひじき さつまいも	あさつき
レンコン かいわれ菜	チンゲン菜 ジャガイモ	メロン すいか
さやいんげん	さやえんどう わけぎ	

平成 10 年度の研究において、我々は大分県産スウィートバジルの有する抗酸化性のうちおよそ 50% が主要香気成分である Eugenol によるものであることを報告した⁽⁴⁾。さらに、大分県産スウィートバジルはポリフェノールを高濃度 (580mg/100g 生葉) に含有することを解明し (Fig.1), 抗酸化性の要因の一つであることを考察した。

近年、抗酸化性とポリフェノールの関係が注目されている。この背景には“フレンチ・パラドックス”と呼ばれる疫学的事実が関与している。フレンチ・パラドックスとは、欧米各国において高頻度に見られる動脈硬化による死亡率と高脂肪摂取 (特に動物性脂肪の大量摂取) との間の正の相関に対して、フランスにおいては高脂肪摂取の割に動脈硬化性疾患の死亡率が少ないという逆説を指す。この原因としては、以前からフランスで消費量の多い赤ワインの寄与が指摘されていた⁽⁵⁾。抗酸化性の発現には、赤ワインに代表されるポリフェノールの関与も考察されており、今後のポリフェノール研究に注目が集まっている。

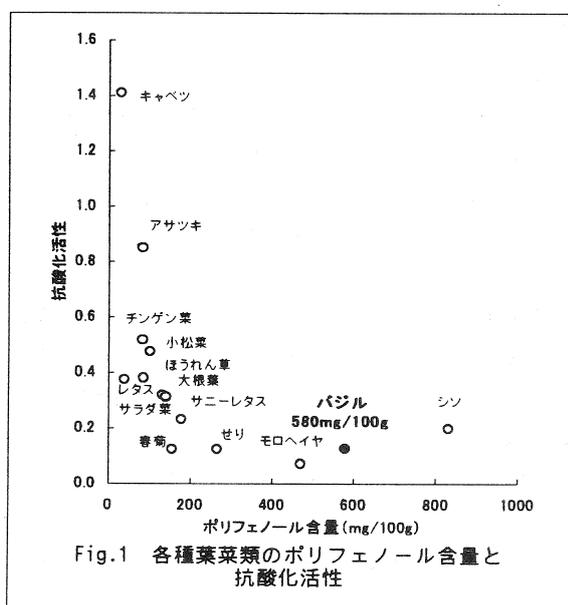


Fig.1 各種葉菜類のポリフェノール含量と抗酸化活性

今年度の研究では、大分県産スウィートバジルの抗酸化性について、活性成分の検索を目的にポリフェノール成分に着目して研究を行った。

2. 実験方法

2.1 サンプルの調製

1999年8月2日に採取したスウィートバジルの生葉 500g をエタノールとともにホモゲナイザー (日本精密工業(株製, ヒストコロン) で磨砕した。濾過した後、残渣をエタノールで洗浄し、洗液と合わせて全量をエバポレ

ーターを用いて減圧蒸発させた。0.2%ギ酸を含む 30% メタノールに懸濁し、さらに濾過してサンプルとした。

2.2 抗酸化活性の測定

2.2.1 β -カロチンを用いた退色法

リノール酸の酸化物が β -カロチンを退色させる作用を利用した津志田等の方法⁽⁶⁾ を一部変更して抗酸化活性を測定した。

β -カロチンは 470nm に吸収を持つ、黄色を帯びた物質であり、酸化されることで 470nm の吸光度が減少する。反応系にサンプルを添加することで吸光度の減少が抑えられ、このことを指標として抗酸化活性を測定した。

すなわち、 β -カロチン溶液 (100mg/100ml CHCl_3), リノール酸溶液 (10g/100ml CHCl_3), Tween40 (20g/100ml CHCl_3) をそれぞれ 0.5ml, 0.2ml, 1.0ml 混合し、窒素気流下クロロホルムを蒸発させた。20mM リン酸緩衝液 (pH6.8) 100ml に静かに懸濁し、これを β -カロチン-リノール酸溶液とした。

この β -カロチン-リノール酸溶液を 2.9ml ずつ試験管に分注し、被験液 50 μ l を注入して 60°C の恒温槽中で反応させた。20 分後、Butylated Hydroxyanisole (BHA) 20mg/100ml 80% エタノール溶液を 50 μ l 添加して酸化反応を停止させ、470nm で酸化されずに残った β -カロチンの吸光度を測定した。

2.2.2 DPPH を用いたラジカル消去能の測定法⁽⁷⁾

安定なラジカル剤 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用いたラジカル消去能を指標に抗酸化活性を測定した。DPPH は 517nm に吸収をもつ化合物 (紫色) であり、ラジカルが消去されることにより、517nm における吸収が消滅する。高速液体クロマトグラフ (HPLC) での DPPH のピーク面積の減少量から非ラジカル体への変換量、つまりラジカル消去能を測定した。

すなわち、100mM Tris-HCl Buffer (pH7.4) 80 μ l, 500 μ M DPPH エタノール溶液 100 μ l, 被験液 20 μ l をサンプルチューブ中で激しく攪拌し、20 分間暗所で放置した。放置後、以下に示す HPLC 装置を用いて DPPH を分離定量した。

Column : TSKgel Octyl-80Ts (4.6 ϕ \times 150mm)

Eluent : MeOH/H₂O (70/30)

Flow rate : 0.8 ml/min

Temp. : 35°C

Detect : 517nm

Sample : 20 μ l

標準の抗酸化性物質として、6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) を用

い同様な操作を行い、抗酸化活性を Trolox 相当量として求めた。

2.3 ポリフェノールの定量

フオリン試薬を用いる Swain 等の方法⁽⁸⁾を一部改良し測定した。すなわち希釈したサンプル 2ml に 2 倍希釈のフオリン試薬 2ml を加え、10%Na₂CO₃ 溶液 2ml を加え、30°C で 30 分間保温し、760nm における吸光度を測定した。没食子酸を標準物質として、定量値は没食子酸相当量として算出した。また、必要に応じて反応系をスケールダウンして測定した。

2.4 カラムクロマトグラフィーによる抗酸化活性成分の分離

0.2%ギ酸-30%メタノールで平衡化した TSKgel TOYOPEARL HW-40F(40φ×150mm)に 2.1 で調製したサンプル溶液を供した。同液で十分に洗浄した後、0.2%ギ酸-100%メタノールまでの直線的グラジエント溶出を行った。グラジエント終了後さらに 0.2%ギ酸-メタノールで溶出した。溶出液を 3ml ずつ分画し、2.2.1 に従って抗酸化活性を、2.3 に従ってポリフェノール含量をそれぞれ測定した。

2.5 HPLC による抗酸化活性成分の分離

以下に示す条件により、抗酸化活性成分を分離した。

Column : TSKgel ODS-120T (4.6φ×250mm)
 Eluent : A ; 0.2%ギ酸-アセトニトリル
 B ; 0.2%ギ酸-H₂O
 10%A→50%A の直線的グラジエント
 Flow rate : 0.8 ml/min
 Temp. : 40°C
 Detect : 280nm
 Sample : 10μl

3. 結果及び考察

3.1 スウィートバジルからの抗酸化活性成分の分離について

TSKgel TOYOPEARL HW-40F(40φ×150mm)によるスウィートバジル抽出液のクロマトグラフィー・パターンを Fig.2 に示す。分画した各フラクションについて 2.2.1 に従ってβ-カロチン退色法で抗酸化活性を測定し、2.3 に従ってポリフェノール含量を測定した。メタノール濃度の上昇とともにポリフェノールの溶出が見られた。各ポリフェノールのピークと抗酸化活性は一致し、抗酸化活性を有したポリフェノール画分であることが確認できた。このポリフェノール画分をフラクションナンバー 91~123, 124~155, 156~165, 209~225, 226~241 の 5 つにまとめ、それぞれフラクション I, II, III, IV, V とした。これらの 5 つのフラクションを遠心濃縮機(タイテック(株)製)を用いて 40°C で濃縮乾固し、白色または黄白色の粉末を得た。

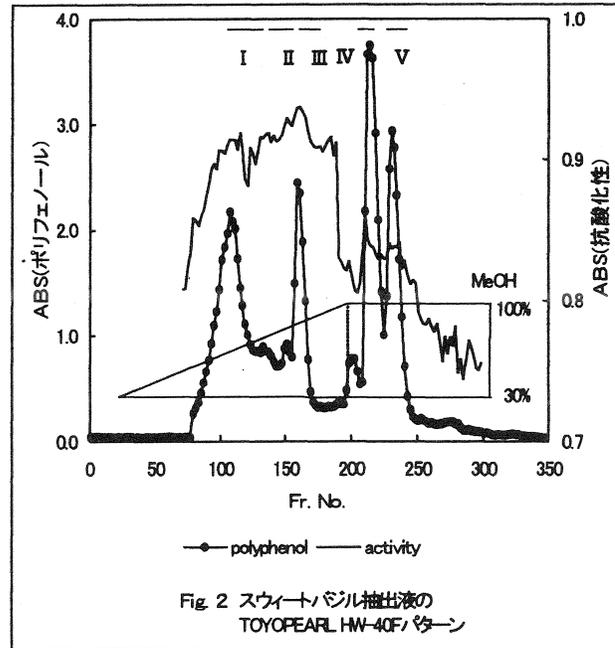


Fig.2 スウィートバジル抽出液の TOYOPEARL HW-40F/パターン

V とした。これらの 5 つのフラクションを遠心濃縮機(タイテック(株)製)を用いて 40°C で濃縮乾固し、白色または黄白色の粉末を得た。

3.2 ポリフェノールフラクション (I~V) の抗酸化活性について

各ポリフェノールフラクション (I~V) を 2mg/ml となるように 0.2%ギ酸を含む 50%アセトニトリルに溶解し、0.45μm のフィルターで濾過したものについて抗酸化活性を 2.2.2 に従って DPPH を用いたラジカル消去能として測定し、2.3 に従ってポリフェノール含量を測定した。結果を Table II に示す。ラジカル消去能は Trolox

Table II 各フラクションの抗酸化活性

Fr.	ラジカル消去能 (μmol/ml)	ポリフェノール量 (mg/ml)	比活性 (activity/mg polyphenol)
I	4.24	0.64	6.63
II	4.42	0.76	5.82
III	13.00	1.62	8.02
IV	10.83	1.03	10.51
V	9.13	0.67	13.63

相当量として、ポリフェノールは没食子酸相当量として表してある。活性量、ポリフェノール量ともにフラクション III で最も高かった。活性量は次いでフラクション IV, V と多かった。しかしながら、比活性(総活性量をポリフェノール mg 量で除した値、単位ポリフェノールに対する活性の強度を示す)を算出したところ、フラクション V が最も高く、次いで IV, III の順であった。これはフ

ラクションVで活性成分純度が最も高いか、活性成分自体の能力が高いかのいずれかであると考えられる。

3.3 フラクションI～VのHPLC分析について

2.5に従ってフラクションI～VのHPLC分析を行った。各フラクション(I～V)を2mg/mlとなるように0.2%ギ酸を含む50%アセトニトリルに溶解し、0.45μmのフィルターで濾過したものをサンプルとした。結果をFig.3-1～Fig.3-5に示す。フラクションI～IIIでは36分ほどにEugenolのピークが溶出され、特にI, IIでは主要な構成成分であった。III, IV, VではEugenol以外に主要成分が1成分ずつ検出された。それらはすべて溶出時間が違うため構造的に異なったものであると言える。

Table IIを考えあわせるとフラクションI, IIでの抗酸化活性のほとんどはEugenolによるものではないかと考察した。また、フラクションIII, IV, Vでの主要成分は強い抗酸化活性を有していることが期待される。

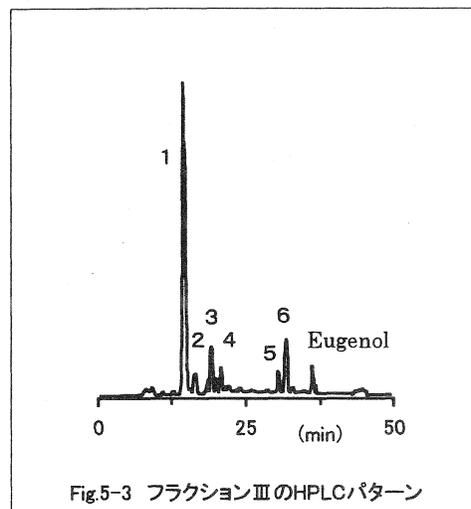


Fig.5-3 フラクションIIIのHPLCパターン

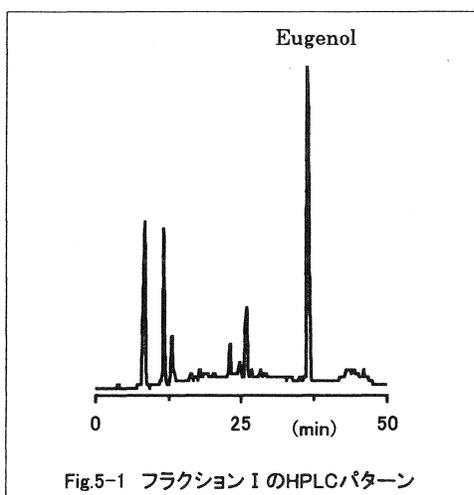


Fig.5-1 フラクションIのHPLCパターン

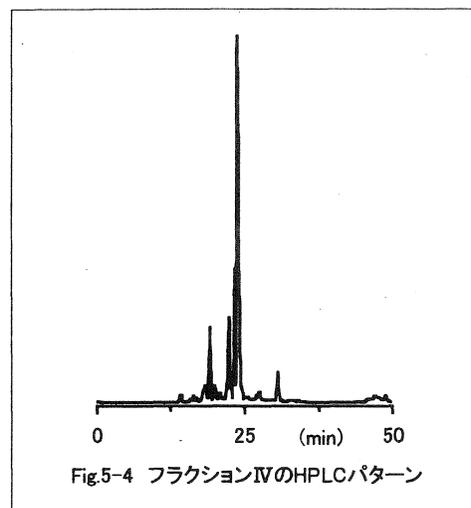


Fig.5-4 フラクションIVのHPLCパターン

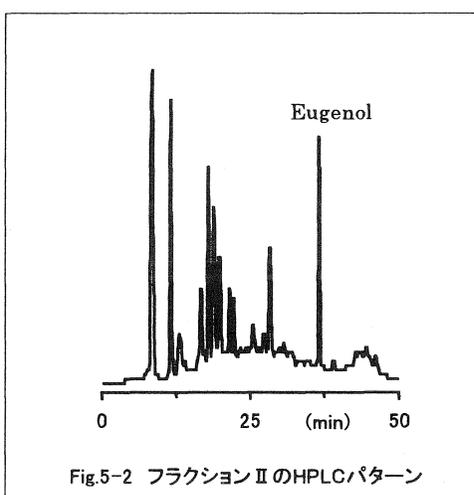


Fig.5-2 フラクションIIのHPLCパターン

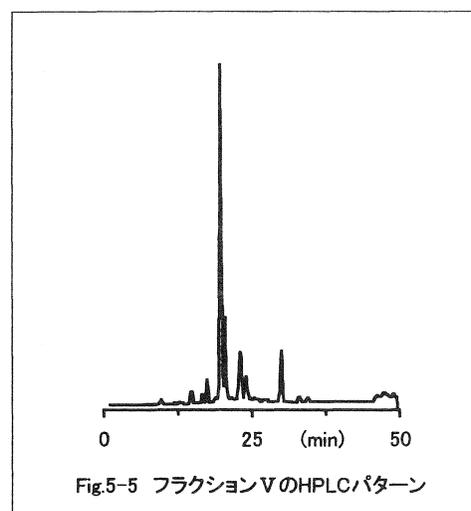


Fig.5-5 フラクションVのHPLCパターン

さらに、平成10年度の研究において、我々は大分県産スウィートバジルの有する抗酸化性のうち約50%が主要香気成分であるEugenolによるものであることを報告した⁽⁴⁾が、今回のHPLC分析の結果は、量的に見て、その結果を裏付けるものであると考えた。

以上の考察の結果、フラクションⅢ、Ⅳ、Ⅴの主要成分が抗酸化活性成分である可能性が考えられた。活性が最も高く、ポリフェノール含量も多いフラクションⅢから各ピークの分取と評価を進めることとした。

3.4 フラクションⅢの各ピークの評価について

Fig.3-3で番号を付したピークについて分取を行った。分取したものを遠心濃縮機を用いて40°Cで濃縮乾固した後、得られた粉体を0.2%ギ酸を含む50%アセトニトリルで溶解し、抗酸化活性を2.2.2に従ってDPPHを用いたラジカル消去能として測定した。当初の予想通り、主要成分であるピーク1で抗酸化活性を確認した。ピーク2~6についてはほとんど活性を確認できなかった。

抗酸化活性を有していたピーク1について、2.3に従ってポリフェノール含量を測定した。以上の結果をTableⅢにまとめた。活性の回収率は約47% (6.10/13.00×100)であった。フラクションⅢとピーク1を比

TableⅢ 各ピークの抗酸化活性

No.	ラジカル消去能 ($\mu\text{mol/ml}$)	ポリフェノール量 (mg/ml)	比活性 ($\text{activity/mg polyphenol}$)
1	6.10	0.67	9.10
2	0.30	N.D.	N.D.
3	0.06	N.D.	N.D.
4	0.02	N.D.	N.D.
5	0.01	N.D.	N.D.
6	0.37	N.D.	N.D.

N.D.: Not determined

較すると、比活性が若干上がっているのはフラクションⅢに含まれていた他のポリフェノール成分が除去されたことを示していると考えた。しかし、8.02から9.10とその上昇が微弱であることからフラクションⅢにおける抗酸化活性の主体はピーク1の成分であると考察した。

今後はフラクションⅣ、Ⅴについても同様な評価を行い、抗酸化活性成分の単離と構造解析を行う予定である。

植物由来のポリフェノールはその基本骨格からいくつかの種類に分類されている。その1種がフラボノイド類であるが、フラボノイド類も構造の特徴からフラボンやフラボノールなど数多くに類別されている。

スウィートバジル由来のポリフェノールについての知見は現在のところ知られていないが、スウィートバジル

が属するシソについては、その種子からルテオリン、アピゲニン、クリソエリオールなどのフラボン類が確認されている。また、種子にはアグリコンが多く含まれているのに対して葉には配糖体で含まれているという報告もある⁽⁹⁾。シソの葉や種子に含まれるポリフェノールは抗アレルギー作用や抗炎症作用などの機能性があるとされており⁽⁹⁾、企業化の報告もある。スウィートバジルはシソ科に属する植物であり、ポリフェノール含量が多いことからシソに見られるような機能性の存在も類推できる。今後のスウィートバジル由来ポリフェノールの構造解析と機能性解明に関心が寄せられている。

4. まとめ

大分県産スウィートバジルの抗酸化性について、抗酸化活性成分の検索を目的に研究を行ったところ次のような結果を得た。

- (1)大分県産スウィートバジルのエタノール抽出液をTSKgel TOYOPEARL HW-40Fに供したところ活性を有する5つのポリフェノールフラクションに分画できた。
- (2)フラクションⅢ、Ⅳ、Ⅴで高い活性を示し、フラクションⅢではポリフェノール含量も多かった。
- (3)各フラクションをHPLC分析に供したところ、Ⅰ、Ⅱでは多くのピークが検出されたが、Eugenolも含まれており、フラクションⅠ、Ⅱの活性はほとんどEugenolによるものと考察した。また、ピーク面積から見て、スウィートバジル抗酸化性のおよそ50%がEugenolに由来するという結果を裏付けた。
- (4)フラクションⅢ、Ⅳ、Ⅴでは主要成分が1成分ずつ検出され、抗酸化活性成分である可能性が考えられた。
- (5)抗酸化活性、ポリフェノール量ともに高かったフラクションⅢについて、HPLCで溶出されたピークを分取し、活性を確認したところ、主要成分であるピーク1で高い活性を示した。比活性の値からピーク1はフラクションⅢの抗酸化活性の主体であることが考察された。

参考文献

- 1)大澤俊彦:「発がん予防研究『デザイナードーズ』計画の現状と動向」, 1, (1996), p32-38, 栄養と健康のライフサイエンス
- 2)山本展久, 水江智子, 望月 聡:平成9年度大分県産業科学技術センター研究報告, (1998), p122-125
- 3)山口迪夫, 中嶋洋子:「栄養の生活科学」, (1990), p110-111, 同文書院

- 4)山本展久,水江智子,佐野一成,高野 濟,望月 聡:
平成 10 年度大分県産業科学技術センター研究報告,
(1999), p181-184
- 5)近藤和雄,岩本珠美:日本食品工業学会誌,
41(14)(1998), p42-48
- 6)津志田藤二郎,鈴木雅博:日本食品工業学会誌,
41(9)(1994), p611
- 7)T.YAMAGUCHI,H.TAKAMURA,T.MATOBA,
J.TERA0 : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(6)(1998),
p1201-1204
- 8)T.SWAIN,W.E.HILLIS : *J.Sci.Food Agric.*, 10(1959),
p63-
- 9)食品と開発, 34(6)(1999), p21-29