

乾燥温度及び抽出法の違いによるハーブ類の抗酸化活性*

柚木崎千鶴子*¹・小村 美穂*¹・小坂 妙子*²・堂園 眞澄*³

Antioxidant Activity of Herbs and the Effect of Drying and Extracting condition

Chizuko YUKIZAKI, Miho KOMURA, Taeko KOSAKA and Masumi DOZONO

昨年度実施した県内農産物の抗酸化活性測定において非常に高い活性を示したハーブ類のうち、レモンバームとブラックペパーミントを材料として乾燥試験及び抽出試験を実施した。真空凍結乾燥及び熱風乾燥（45℃、55℃、65℃）処理をしてDPPHラジカル消去活性、ポリフェノール含量、ロスマリン酸量、がん細胞増殖抑制効果を検討したところ、いずれも乾燥温度が低い方が活性、含量ともに高いことがわかった。また、水あるいは80%エタノールで抽出してDPPHラジカル消去活性を検討した結果、抽出温度が高くなるにつれて活性が高くなることがわかった。特に水抽出においては、80℃以上の抽出で顕著に活性が高くなることから、80℃未満の抽出では、酸化酵素の作用で抗酸化活性が抑制されるのではないかと示唆された。

キーワード：ハーブ、抗酸化、がん細胞、乾燥、抽出

1 はじめに

近年、活性酸素ラジカルによる生体成分の酸化により種々の疾病が引き起こされることが明らかになってきた。それに伴い、食品機能のひとつとして抗酸化活性が注目され、多くの抗酸化成分が食品から単離されている¹⁾。一般にシソ科の植物は抗酸化活性が強いと言われており、セージ、ローズマリー、オレガノ等の抗酸化成分が明らかにされている^{2) 3)}。

一方、本県では平成13年度に総合農業試験場薬草・地域作物センター（宮崎県西諸県郡野尻町）が設置され、農産物ブランドの補完的作物としてハーブ類の栽培推進が図られている。ハーブ類は、自然乾燥や熱風乾燥により乾燥品として利用される場合が多い⁴⁾が、その乾燥特性についての報告は少ない。本研究では、昨年実施したハーブ類の抗酸化活性試験の結果、活性が高かったレモンバ

ム（*Melissa officinalis*）とブラックペパーミント（*Mentha×piperita cv.*）を用いて乾燥試験及び抽出試験を実施し、抗酸化活性及びがん細胞増殖抑制能の変化を調べたので報告する。

2 実験方法

2-1 原材料及び前処理方法

総合農業試験場薬草・地域作物センターで栽培されたレモンバームとブラックペパーミントを5月下旬に収穫し、水洗後水切りして乾燥試験に供した。また、対照として真空凍結乾燥（真空凍結乾燥機、FTS SYSTEM、Dura-Top MP & Dura-Dry MP、以下FDと略す）を行った。乾燥物は、太い茎を除き、超遠心粉碎機（MRK & RETSCH, EM-1型）で0.5mmスクリーンを通して粉碎し粉末試料とした。

2-2 熱風乾燥試験

あらかじめ45、55、65℃に設定した乾燥機3台（ADVANTEC FV-1000, ADVANTEC FC-612, 1SUZU CSO-21ED）にレモンバームとブラックペパーミントを分け入れ、1時間ごとに重量を測定し、ほとんど重量変化が無くなるまで乾燥し

* ハーブ類の機能性把握と加工食品への利用に関する研究（第4報）

* 1 食品開発部

* 2 県衛生環境研究所

* 3 県総合農業試験場

（現 宮崎県農政水産部中部農業改良普及センター）

た。また、庫内の風量・温度差の影響を避けるため、重量測定時に棚の入れ替えを行った。

2-3 抽出試験

水又は80%エタノールを溶媒として、それぞれ20°Cから沸点付近まで温度を変えて抽出試験を実施した。

水の場合は、20°C, 40°C, 60°C, 70°C, 80°C, 95°Cに加温した湯50gを0.5gのレモンバーム粉末に加えて、各温度に設定した湯浴中でスターラーで攪拌しながら10分間抽出した。その後直ちに0.45 µm フィルターでろ過し氷冷した。

80%エタノールの場合は、あらかじめサンプルチューブに50ml取って、20°C, 40°C, 60°C, 70°C, 73°Cに加温した後0.5gのレモンバーム粉末に加えて上記と同様の操作で抽出液を調製した。

2-4 明度・色度の測定

分光測色計 (MINOLTA CM-2002) を用いて、 $L^*a^*b^*$ 表色系により、粉碎した試料の明度、色度を測定した。

2-5 DPPHラジカル消去活性の測定

既報⁵⁾に準じ96穴マイクロプレート法にて測定した。すなわち、マイクロプレート各ウェルに2-3で調製した試料抽出液、pH6.0の200mM MES (2-morpholinoethanesulphonic acid, 同仁化学) 緩衝液を順次加えた。次いで、1200 µM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 和光純薬) エタノール溶液を8連ピペットを用いて加え反応を開始させ、室温で20分間放置後、520nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (ナルジェンクインターナショナル、Immuno Mini NJ-2300) で測定した。なお、反応液の最終エタノール濃度は50%になるように調製し、活性は、粉末試料絶乾物1g当たりのTrolox (Aldrich) 相当量として3連の平均値を表示した。

2-5 ポリフェノール含量の測定

粉末試料0.25gに80%メタノールを加え25mlに定容し、室温下、超音波洗浄機で15分間抽出操作を行った。抽出液を0.45 µm フィルターでろ過し、フォーリンチオカルト法⁶⁾でポリフェノール含量を測定し、絶乾物1gあたりの没食子酸(関東化学)相当量として3連の平均値を表示した。

2-6 ロスマリン酸の定量

レモンバームの粉末試料0.5gに80%エタノール溶液80mlを加え5分間ホモジナイザー処理を行い抽出した。この操作を2回繰り返した後3000回転で5分間遠心分離し、上澄み液全量を200mlに定容したものをHPLC試験用液とし定量した。また、ピークの同定はLC-MS (Agilent 1100LC-MSD SL) により同定した。HPLCの測定条件は以下のとおりであった。

HPLCの測定条件

装置：島津10AVP

検出器：SPD-M10AVP

測定波長：UV280nm

カラム：Inertsil ODS-3 4.6×150mm

移動相：A液；0.5%酢酸

B液；(0.5%酢酸含有) 90%CH₃CN

グラジェント：B液；20→90% (20分) - 90% (10分) - 90→20% (5分)

2-7 HL60ヒト白血病細胞増殖抑制試験

乾燥粉末試料1gに30mlの80%エタノールを加えて30秒間ボルテックスで攪拌し、No.5Aのろ紙で吸引ろ過後エバポレーターで濃縮し、さらに凍結乾燥し抽出物を得た。抽出物はDMSOに200 mg/mlで再溶解し供試サンプルとした。

HL60ヒト白血病細胞 (RCB0041) は(独)理化学研究所バイオリソースセンターより分譲されたものを10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地で、37°C、5%CO₂存在下、相対湿度100%で培養した。

測定培地中でサンプル終濃度が62.5、125、250、500 µg (extract)/mlになるようにPBS(-)で希釈し、1 µl ずつ96穴プレートに分注した。ここに細胞懸濁液 (1×10⁵ cells/ml) を99 µl ずつ加えて混合し、48時間培養した。その後、テトラカラーワン試薬 (生化学工業) 10 µl を加えてさらに4時間培養し、650nmの吸光度を参考波長として450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その吸光度から生細胞数を測定することができる。測定は3連で行い、細胞にDMSO/PBS(-) 1 µl を添加したものをcontrolとし、細胞増殖はcontrolの平均吸光度に対する百分率で算出した。また、対control%が50%の時のサン

ル濃度をIC₅₀として増殖抑制活性を示した。

3 結果及び考察

3-1 乾燥試験

レモンバーム及びブラックペパーミントの乾燥に要した時間及び乾燥後の水分は表1のとおりであった。レモンバーム、ブラックペパーミントともに65℃が最も乾燥時間が短かつ水分が低かった。乾燥効率で判断すると65℃での乾燥が最も優れていると言えよう。

表1 乾燥に要した時間及び乾燥物の水分

乾燥温度	FD	45℃	55℃	65℃
レモンバーム乾燥時間	—	22hr	23hr	5 hr
レモンバーム 水分	8.7%	9.8%	7.9%	7.5%
ペパーミント乾燥時間	—	22hr	23hr	8 hr
ペパーミント 水分	10.2%	10.3%	9.8%	8.3%

3-2 明度・色度

レモンバーム及びブラックペパーミントの乾燥温度に伴う色の変化を、図1及び図2に示した。L*a*b*表色系では、L*値が明度、a*値及びb*値は色相と彩度を表す。さらに+a*は赤方向、-a*は緑方向、+b*は黄方向、-b*は青方向を表す。レモンバームではL*値、b*の+値及びa*の-値がFD粉末に比べて熱風乾燥粉末の値が減少し、明るさ、黄色及び緑色の度合いが低下した(図1)。ブラックペパーミントでは、L*及びb*の+値に大きな変化はなかったが、a*の-値は乾燥温度の上昇に従って減少し、緑色の度合いに低下が見

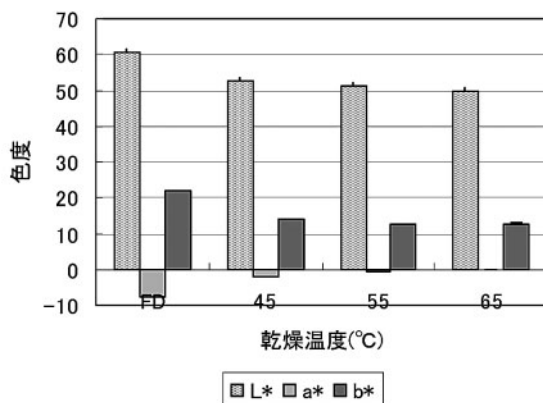


図1 乾燥温度によるレモンバームの色度の違い

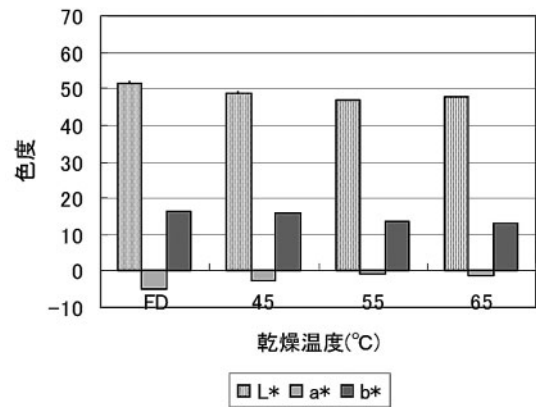


図2 乾燥温度によるペパーミントの色度の違い

られた(図2)。

以上の色の変化は、乾燥中に、葉に含まれるポリフェノールオキシダーゼが作用し、ポリフェノール類からキノン類が生じさらに重合して褐色色素が生成された結果ではないかと考えられた⁷⁾。

3-3 乾燥温度の違いによるDPPHラジカル消去活性、ポリフェノール含量及びロスマリン酸量

レモンバーム及びブラックペパーミント乾燥粉末のDPPHラジカル消去活性及びポリフェノール含量、さらにレモンバーム乾燥粉末のロスマリン酸量を測定した結果を図3及び図4に示した。レモンバーム及びブラックペパーミントのいずれも乾燥温度の上昇に伴ってDPPHラジカル消去活性及びポリフェノール含量が低下した。レモンバームのDPPHラジカル消去活性は、対照のFD粉末では990 μ mol-Trolox相当量/g dryを示したが、45℃乾燥物で490 μ mol-Trolox相当量/g dry、55℃乾燥物で240 μ mol-Trolox相当量/g dry、65℃乾燥物で200 μ mol-Trolox相当量/g dryと減少した。一方ブラックペパーミントにおいても、レモンバームよりは活性が低いものの、対照のFD粉末では480 μ mol-Trolox相当量/g dry、45℃乾燥物で330 μ mol-Trolox相当量/g dry、55℃乾燥物で170 μ mol-Trolox相当量/g dry、65℃乾燥物で160 μ mol-Trolox相当量/g dryと減少した。この結果から、DPPHラジカル消去活性の発現にポリフェノール類が関与していることが示唆された。特にレモンバームではロスマリン酸含量もDPPHラジカル消去活性及びポリフェノール

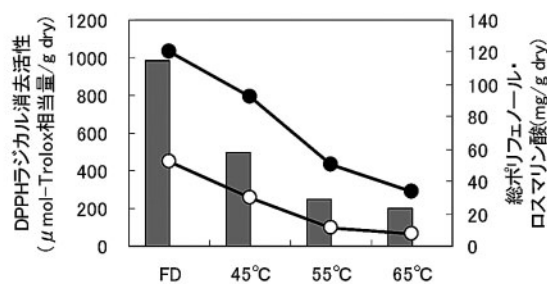


図3 レモンバームの乾燥温度によるDPPHラジカル消去活性、総ポリフェノール量及びロスマリン酸量の変化

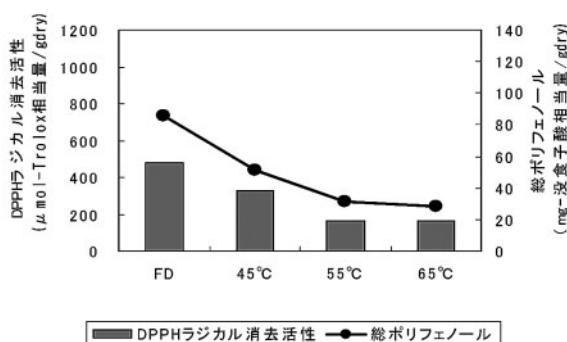


図4 ペパーミントの乾燥温度の違いによるDPPHラジカル消去活性及びロスマリン酸量の変化

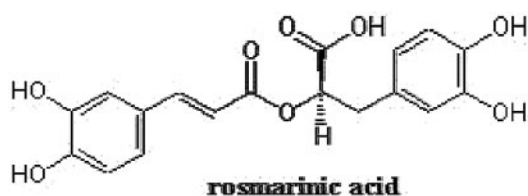


図5 ロスマリン酸の構造式

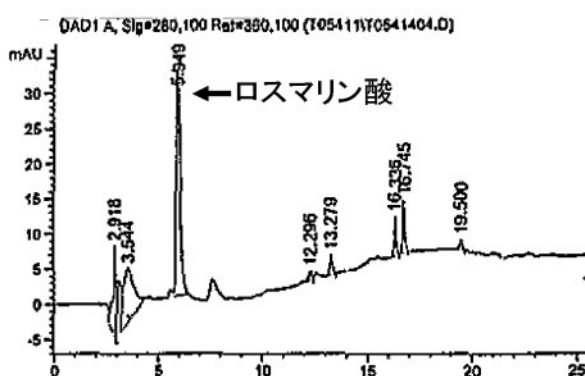


図6 ロスマリン酸のクロマトグラフ

ル含量と共に低下が見られたので、DPPHラジカル消去活性に対するロスマリン酸の寄与率が高いのではないかと考えた。

表2 レモンバームのDPPHラジカル消去活性に対するロスマリン酸の寄与率

乾燥温度	FD	45°C	55°C	65°C
ロスマリン酸量 (mg/g dry)	52.0	30.1	11.0	7.4
寄与率 (%)	37.8	43.6	32.3	27.0

ロスマリン酸は、ローズマリーから単離されたフェノールカルボン酸で、シソ科植物に幅広く分布している⁸⁾。図5に示すようにカフェ酸の二量体でフェノール性水酸基を4つ持つ分子量360の化合物である。

図6にレモンバームFD粉末80%エタノール抽出液のHPLCクロマトグラムを示した。約10個のピークが検出され、その中で最も含量の多いピークをロスマリン酸と同定し、各乾燥粉末のロスマリン酸を定量した。

また、ロスマリン酸(和光純薬)のDPPHラジカル消去活性は7170 μmol-Trolox相当量/gであった。この値からレモンバームのDPPHラジカル消去活性に対するロスマリン酸の寄与率を計算した。表2に示すように、ロスマリン酸の寄与率は27.0%から43.6%と半分以下であったため、ロスマリン酸以外のポリフェノール等もDPPHラジカル消去活性の発現に関与していると考えられた。

以上の結果から、熱風乾燥によりレモンバーム及びブラックペパーミントの抗酸化活性が大きく減少し、さらに乾燥温度が上昇するに従って減少傾向が高まることもわかった。

3-3 乾燥温度によるHL60ヒト白血病細胞増殖抑制効果

レモンバーム及びブラックペパーミントの乾燥粉末より調製した80%エタノール抽出物について、熱風乾燥温度がHL60ヒト白血病細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。

その結果、レモンバームでは、FD粉末80%エタノール抽出物が、添加48時間後のHL60生細胞数を62.5 μg/mlで約41%、125 μg/mlで約0.3%、250 μg/mlで約0.4%及び500 μg/mlで約19.8%と増殖の戻りは見られるものの、濃度依存的に最も強く抑制した(図8)。ブラックペパーミントにおいても、FD粉末80%エタノール抽出物が、

62.5 $\mu\text{g/ml}$ で約75%、125 $\mu\text{g/ml}$ で約4.1%、250 $\mu\text{g/ml}$ で約3.6%及び500 $\mu\text{g/ml}$ で約0%と濃度依存的に最も強く抑制した(図9)。また、熱風乾燥においては、レモンバーム、ブラックペパーミントいずれも45 $^{\circ}\text{C}$ 乾燥粉末80%エタノール抽出物が、55 $^{\circ}\text{C}$ あるいは65 $^{\circ}\text{C}$ 乾燥粉末80%エタノール抽出物に比較して低い濃度で細胞増殖を抑制していることがわかった。

また、ロスマリン酸で同様の試験を行ったところ、31.25 $\mu\text{g/ml}$ で約23%、62.5 $\mu\text{g/ml}$ で約0%と非常に強くHL60の細胞増殖を抑制した(図8)。このことからHL60ヒト白血病細胞の増殖抑制においてもロスマリン酸が関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、レモンバームあるいはブラックペパーミント乾燥粉末の80%エタノール抽出物はHL60ヒト白血病細胞に対する増殖抑制効果を有し、さらに乾燥温度が低い方が効果が高いこと

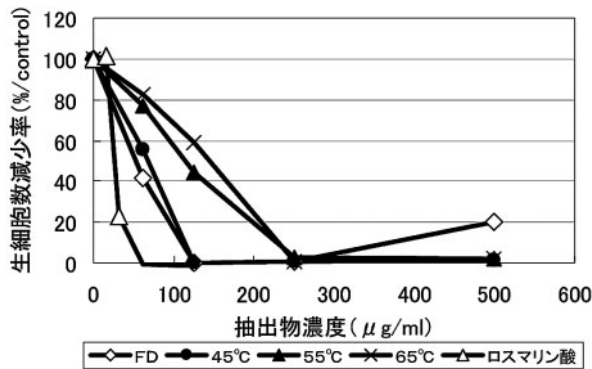


図8 レモンバームの乾燥温度の違いによるHL60増殖抑制効果

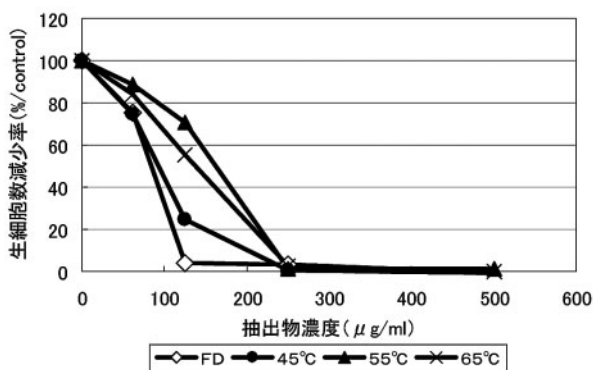


図9 ブラックペパーミントの乾燥温度の違いによるHL60増殖抑制効果

がわかった。

3-4 抽出溶媒・温度の違いによるDPPHラジカル消去活性

レモンバームのFD粉末及び65 $^{\circ}\text{C}$ 乾燥粉末を用いて、水又は80%エタノールにより20 $^{\circ}\text{C}$ ~沸点付近で抽出した場合のDPPHラジカル消去活性を比較検討した。

FD粉末を用いて抽出した場合、図10に示すように水、80%エタノールいずれも、抽出温度が上がるに従ってDPPHラジカル消去活性が高くなった。同一温度で水抽出液と80%エタノール抽出液のDPPHラジカル消去活性を比較すると、見かけ上、80%エタノール抽出液の方が活性が高かった。また、水抽出の場合、70 $^{\circ}\text{C}$ から80 $^{\circ}\text{C}$ にかけて顕著に活性が上がっている。併せて図11に示す抽出液の色を見ると、20, 40, 60 $^{\circ}\text{C}$ では、10分間の抽出で著しく褐変しているのがわかる。このことから、70 $^{\circ}\text{C}$ 以下の抽出では、残存するポリフェノールオ

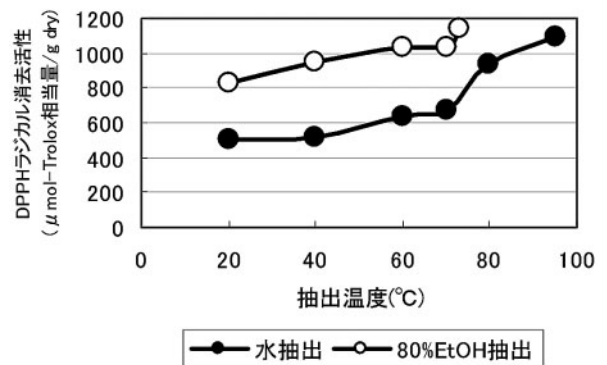


図10 レモンバームFD粉末の抽出温度の違いによるDPPHラジカル消去活性

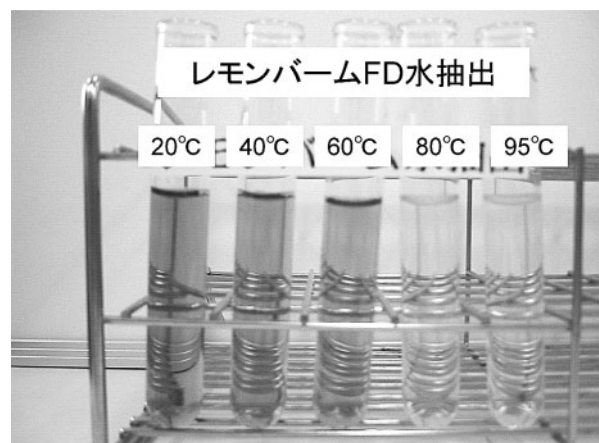


図11 レモンバームFD粉末水抽出液の色調

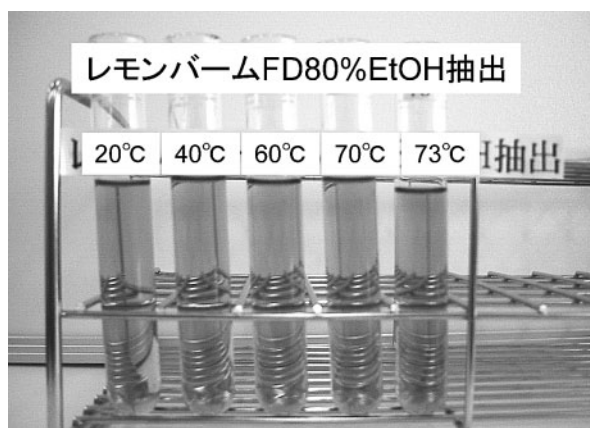


図12 レモンバームFD粉末80%エタノール抽出液の色調

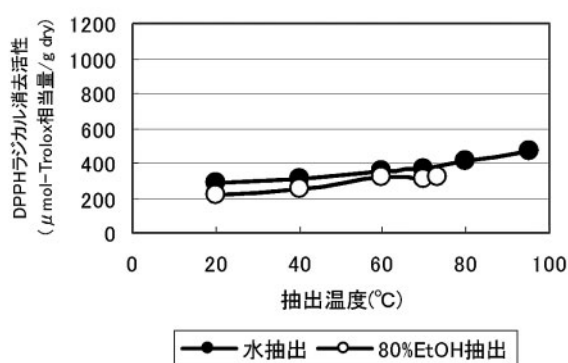


図13 レモンバーム65°C乾燥粉末の抽出温度の違いによるDPPHラジカル消去活性

キシダーゼにより、フェノール性水酸基が酸化されて、DPPHラジカルを補足できなくなり活性の低下につながったものと考えられた。また、80%エタノール抽出液では、抽出温度による液色の違いは見られず、いずれも同程度に緑色を呈していた(図12)。ポリフェノールオキシダーゼ活性は抑制されているものと考えられた。ポリフェノールオキシダーゼ活性が阻害されていると考えられる80°C以上で水抽出した場合は、80%エタノールと同等の活性が見られることから、活性成分は、水及び80%エタノールに溶解性が高く、比較的熱に安定なポリフェノール類と考えられた。

レモンバーム65°C乾燥粉末を用いて同様の抽出試験を行った結果を図13に示す。3-3で示したように65°C乾燥粉末は、乾燥中にすでに酸化を受けていると考えられ、FD乾燥粉末と比較して約80%近くDPPHラジカル消去活性が低下している。

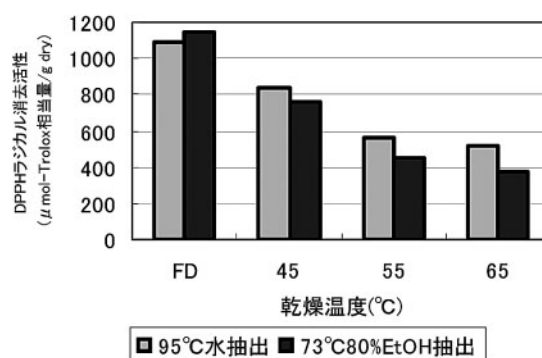


図14 レモンバームの乾燥温度の違いによるDPPHラジカル消去活性

そのため、抽出温度の上昇につれてDPPHラジカル消去活性に上昇がみられるものの、その割合は小さく、水抽出と80%エタノール抽出の差もわずかであった。

レモンバーム乾燥粉末を用いて、水あるいは80%エタノールで抽出した場合、最も高い活性を示した95°C、73°CにおけるDPPHラジカル消去活性を図14に示す。95°Cの熱水を使用することで抽出中の酵素酸化の影響を排除して溶媒の違いを比較した。いずれの溶媒も乾燥温度が高くなるにつれて活性が低下し、3-3の結果を追認できた。また、溶媒による活性の差はあまりなかったが、熱風乾燥では、各温度帯で水抽出の方がわずかに活性が高く、乾燥温度が高くなるにつれて、溶媒間の活性の差が大きくなる傾向がみられた。

以上の結果から、より抗酸化活性の高い抽出液を得るためには、できるだけ高い温度で抽出する必要があることがわかった。特に水抽出の場合は80°C以上で酸化酵素を失活させて抽出することで、抗酸化活性が顕著に上昇した。

4 まとめ

県内で栽培されたレモンバームとブラックペパーミントを用いて乾燥試験及び抽出試験を行い、抗酸化活性の変化を調べたところ以下の知見が得られた。

- 1) 熱風乾燥による明度・色度の変化はレモンバーム、ブラックペパーミントいずれも a^* の一値の減少がみられ緑色が低下していることがわかった。

- 2) レモンバーム、ブラックペパーミントいずれも乾燥温度の上昇に伴い、DPPHラジカル消去活性及びポリフェノール含量が低下したことから、DPPHラジカル消去活性の発現にポリフェノールが関与していることが示唆された。また、抗酸化活性の発現に乾燥温度が重要な役割を果たしていることがわかった。
- 3) レモンバームに関しては、乾燥温度の上昇に伴い、ロスマリン酸量も減少した。ロスマリン酸の抗酸化活性に占める寄与率を計算するといずれの乾燥温度帯でも50%以下であったことからロスマリン酸以外のポリフェノールの関与も大きいのではないかと推察された。
- 4) レモンバームおよびブラックペパーミント乾燥粉末80%エタノール抽出物は、HL60ヒト白血球細胞に対する増殖抑制効果を有し、乾燥温度が低いほどその効果は高かった。さらにロスマリン酸は最も高い増殖抑制効果を示し、レモンバームの増殖抑制効果に関与していると推察された。
- 5) レモンバーム乾燥粉末を用いてDPPHラジカル消去活性に及ぼす抽出温度の検討を行ったところ、水、80%エタノールいずれも抽出温度が高くなるにつれて活性は高くなった。
- 6) レモンバーム乾燥粉末を用いて水及び80%エタノール抽出におけるDPPHラジカル消去活性の違いを調べたところ、沸点付近ではほとんど差がなかった。
- 7) 以上の結果から、レモンバーム及びブラックペパーミントにおいては、乾燥温度が低い方が、DPPHラジカル消去活性及びHL60ヒト白血球細胞増殖抑制効果が高くなることがわかった。
- 8) レモンバーム乾燥粉末では、水及び80%エタノール抽出において沸点付近での抽出が最もDPPHラジカル消去活性の発現が高く溶媒の差はさほど大きくなかった。

5 参考文献

- 1) 大澤俊彦, 酸化ストレス制御を中心とする食品機能因子の化学と作用機構に関する研究, 日本農芸化学会誌, **76-9**, p.804-813(2002)
- 2) 増田俊哉, セージ、ローズマリーに含まれる強力なジテルペノイド抗酸化性物質の抗酸化機構, *FFI JOURNAL*, **209-10**, p.858-865(2004)
- 3) 藤江歩己, 吉田久美, 大羽和子, オレガノ葉のポリフェノール化合物, 日本食品科学工学会誌, **50-9**, p.404-410(2003)
- 4) リチャードメイビー, ハーブ大全, 小学館, p.274-276(1996)
- 5) 沖 智之, 増田真美, 吉田 収, 西場洋一, 須田郁夫, 紫サツマイモを原材料としたチップスのラジカル消去活性, 日本食品科学工学会誌, **48-12**, p.926-932(2001)
- 6) 津志田藤二郎, 食品機能研究法, 光琳, p318-322(2000)
- 7) 中林敏郎, 食品の変色の化学, 光琳, p.71-88(1995)
- 8) 中谷延二, 菊崎泰枝, 食品中のポリフェノール抗酸化活性, 日本農芸化学会誌, **69-9**, p.1189-1192(1995)