

抗酸化性成分の評価法の検討

中居千和*
片山直浩*
松田克哉*
浜岡容子**

茶葉の熱水抽出物中には多数の未同定成分が含まれており、その一部は抗酸化性を有するとされ、天然の機能性化合物として利用できる可能性がある。そこで、茶葉の熱水抽出液中に含まれる成分ごとの抗酸化性の有無を判断するため、ポストカラム DPPH-HPLC 分析法を適用した。反応コイル長を適切に選択することで、熱水抽出液中の未同定成分について、成分ごとに抗酸化性の有無を検出できることが分かった。

1. 緒言

丹後地域では、平成 16 年から丹後国営開発農地の新規品目として茶の栽培が行われている。茶に含まれるカテキン類は抗酸化作用を持つことが広く知られており¹⁾、サプリメントや化粧品等の商品も数多くみられる。丹後地域の企業においても、カテキン類を配合した化粧品の開発が行われている。今後、茶そのものの生産だけでなく、抗酸化性を生かした高付加価値の商品開発が広がれば、地域の活性化にもつながると考えられる。

茶の独特な色やにおいは嗜好品としては利点である一方、多様な商品へと展開していくには制約となるため、抗酸化性をもつ有効な成分のみを抽出する必要がある。一般的には、茶に含まれるカテキン類の抽出は、有機溶媒を使用する。しかし、有機溶媒を使用するには排気装置の設置、廃液処理の問題など有機溶媒を使用する工場などが少ない地域では技術・設備面でのハードルが高い。そこで、熱水抽出が考えられるが、茶葉の熱水抽出液ではカテキン類のエピマー化や重合が起こり、茶に含まれる主要成分とされるエピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキン以外の成分が生成することが知られている¹⁾。これらのエピマー化や重合した成分は高速液体クロマトグラフ(HPLC)分析でピークとして検出できても、抗酸化性を評価することはできない。一方で、抗酸化性試験の方法として 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)法があるが²⁾、混合物を対象とするため、成分ごとの抗酸化性の有無は判断できない。

そこで、構成成分ごとの抗酸化性が評価できれば、

抗酸化性物質の分離精製などのターゲット決定の有効な手段となる。本研究では、DPPH 法を HPLC に適用することにより、成分分離と同時に成分ごとの抗酸化性が判断できるポストカラム DPPH-HPLC 分析法³⁾に着目した。ポストカラム DPPH-HPLC 分析法は、ぶどう種子⁴⁾、各種農産物⁵⁾などに適用され、成分ごとの抗酸化性の評価に使用されている事例がある。しかしながら、分析システムの構成要素の一つであり、感度や分離に重要な影響を及ぼす反応コイル長についての知見は十分とは言えず、茶葉の熱水抽出液(以下、熱水抽出液とする)の分析にそのまま適用できるものではない。本報告では、上記手法を熱水抽出液に適用すること、及び本分析に最適なコイル長を決定するとともに反応コイル長の最適化手順を確立することを目的とし、検討を行った。

2. 供試材

茶葉は京丹後市産の「やぶきた」2 番茶から軸を除いたものを使用した。この茶葉 10g に抽出溶媒として水道水を日本ミリポア株式会社製純水製造装置 Elix3 にて精製した水 1L を加え、95°C、2 時間抽出した。この抽出液を HPLC 用蒸留水で 10 倍に希釈し、メンブランフィルター(ADVANTEC 製: DISMIC-25cs Cellulose Acetate 0.45 μm)にてろ過したものを熱水抽出液として HPLC 測定に供した。また、茶葉 1.00g を 100mL メスフラスコに加え、アセトニトリルと蒸留水を 60mL ずつ混合した溶媒を標線まで注ぎ、攪拌子を入れて 40 分間攪拌した。得られた懸濁液を 0.45mm ステンレス篩にてろ過後、蒸留水で 2 倍に希釈し、メンブランフィルター(ADVANTEC 製:

DISMIC-25cs Cellulose Acetate 0.45 μ m)にてろ過したものを茶葉の有機溶媒抽出液(以下、有機溶媒抽出液とする)として HPLC 測定に供した。

HPLC による分析には、90%ギ酸(和光純薬製、特級)、メタノール(和光純薬製、HPLC 用)、アセトニトリル(和光純薬製、HPLC 用)、蒸留水(和光純薬製、HPLC 用)、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)(東京化成工業株式会社製)を使用した。標準品として(-)-エピガロカテキンガラート(長良サイエンス、 \geq 98%、EGCG)、(-)-エピガロカテキン(和光純薬、98.0%、EGC)、(+)-カテキンハイドレート(長良サイエンス、 \geq 99%、無水物として C)、エピカテキン(和光純薬、98.0%、EC)、エピカテキンガラート(長良サイエンス、 \geq 99%、ECG)、カフェイン(和光純薬、98.0%、caffein)を用い、各成分が200ppmになるように、10%アセトニトリル水溶液で調製した。

3. 装置

3.1 ポストカラム DPPH - HPLC 分析

ポストカラム DPPH-HPLC 分析法の概略図を図1に示す。オートサンプラーから導入された試料は、ODS カラムで成分ごとに分離されたのち、DPPH と混合され、コイル内で反応する。分離された成分に抗酸化性があればラジカル消去活性により、DPPH の紫色が退色し吸光度が減少する。PDA 検出器を用いることにより、分離成分を検出する231nmとDPPHを検出する517nmを同時に測定できるため、分離成分の検出と各分離成分のDPPHラジカル消去能の有無を同時に分析できる。

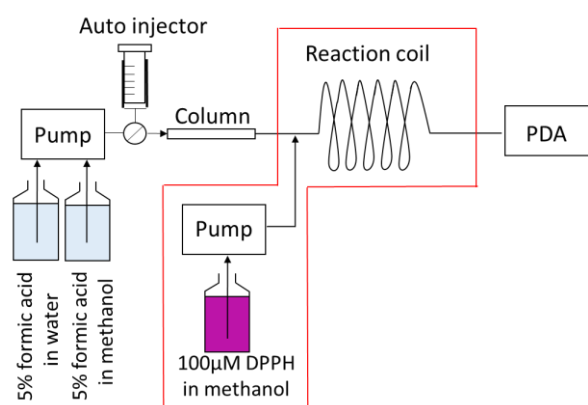


図1 ポストカラム DPPH-HPLC 分析法 概略図

4. 実験

4.1 反応コイルの検討

ポストカラムDPPH - HPLC 分析法の反応コイルは、HPLCで分離された成分とDPPHが反応する場であり、

コイルの長さによって反応時間は変化する。コイルが長すぎるとデッドボリュームの増加により分離成分のピークがブロードになり、短ければ分離成分と DPPH の反応が十分に行われず、517nm における反応後の DPPH の検出感度が十分に得られない。良好なピーク分離をできるだけ維持しながら、抗酸化性の検出感度を得るのに最適なコイル長さを決めるため、内径いずれも 0.5mm、長さ 0.5m、1m、1.5m の 3 種類のコイルを用いカテキン類の標準品を試料として分析した。

分析装置は島津製作所製高速液体クロマトグラフ LC-10A システムを用いた。カテキン類の分離条件は、カラムは Waters 社製 Atlantis T3 5 μ m 4.6 \times 150mm Column、移動相は A 液:水-5%ギ酸 (95.0:5.0,V/V)、B 液:メタノール-5%ギ酸 (95.0:5.0, V/V)、グラジエント条件は、0 分で A 液 79%、B 液 21% から開始し、10 分の時点で B 液が 32%になるように直線的に増加させ、さらに 20 分の時点で B 液が 63%になるように増加させ、1 分で初期の状態に戻し、25 分まで維持した。流量は移動相 A、移動相 B の合計で 1.0ml/min、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、検出波長は 231nm(PDA 検出器)、注入量は 10 μ l とした。

ポストカラムシステムでは、分離された成分を内径 0.5mm、長さ 0.5m、1m、または 1.5m の反応コイル内で 100 μ M DPPH メタノール溶液と混合させた。流量は 0.5ml/min、反応温度は 40 $^{\circ}$ C、検出波長は 517nm(PDA 検出器)とした。

4.2 茶抽出液の分析

有機溶媒抽出液と熱水抽出液をポストカラム DPPH - HPLC 分析法で分析し、ピークを比較することでエピマー化や重合により生成したと考えられる成分から、抗酸化性を有するものを検出できるか検証を行った。分析装置、分析条件、注入量等は 4.1 と同様である。

5. 結果及び考察

5.1 コイル長によるピーク形状と検出感度の変化

コイル長を 0.5m、1m、1.5m とし、検出波長 231nm 及び 517nm にて標準品を分析した結果をそれぞれ図 2 と図 3 に示す。図 3 では、DPPH が抗酸化性成分により還元された際に 517nm の吸収が減少するため、反転ピークとして現れる³⁾。図 2 と図 3 のクロマトグラムから、それぞれのコイル長が長くなるほどピークの保持時間が長くなり、ピークがブロード化していることがわかる。1.5m では EGCG と caffein のピークが完全に

分離されておらず、DPPH との反応ピークもブロードになり、2 成分のどちらに抗酸化性があるのかクロマトグラムだけでは判断できなかった。これはコイル長が長くなるほど、デッドボリュームが増加し、カラム直後では分離されているが、コイル内で拡散したためだと考えられる。

続いて、抗酸化性の検出感度がコイル長によりどのような影響を受けるかを評価した。検出感度 R を次の(1)式のように定義した。

$$R = \frac{S_{517nm}}{S_{231nm}} \dots (1)$$

式中の S_{231nm} は分離成分のピーク面積であり、 S_{517nm} は分離成分と反応した DPPH の反転ピーク面積を表す。この R を用いることで、231nm のピークに対して、DPPH のピークがどの程度検出できるかわかり、抗酸化性の検出感度を評価できると考えた。

S_{231nm} 、 S_{517nm} 、 R の値を表 1 に示す。表 1 からコイル長が長くなるほど、抗酸化性の検出感度を示す R の値が大きいくことがわかった。しかし、1.5m では EGCG と caffeine の分離が完全でなく、反転ピークもブロードとなり、EGCG の R 値が算出できなかった。コイル長 0.5m と 1m を比較すると、1m では R 値が 0.5m の約 2 倍であった。加えて、反転ピークが一番小さい EC において、0.5m では 1m と比較して、EC のピークがポンプの脈流から生じるノイズとピーク高さに明確な差が見られず、抗酸化性を有すると判断するのは困難であった。

コイルが長いほど分離成分のピークのブロード化の程度は大きくなる一方、分離成分と DPPH の反応時間は増加するため、検出感度 R は良くなった。両者はトレードオフの関係なので、最適な分析結果を得るためには、試料成分ごとの分離度を維持しつつ、分離成分と DPPH の反応時間を最大限に得られるコイル長を選択する必要がある。以上のことから、成分ごとに抗酸化性を判断できる程度にピークが分離できており、検出感度 R が十分に高い 1.0m の反応コイルを採用し茶抽出液の分析を行った。

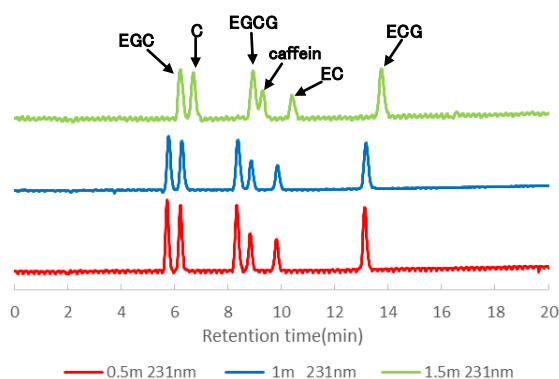


図 2 カテキン類標準品のクロマトグラム (231nm)

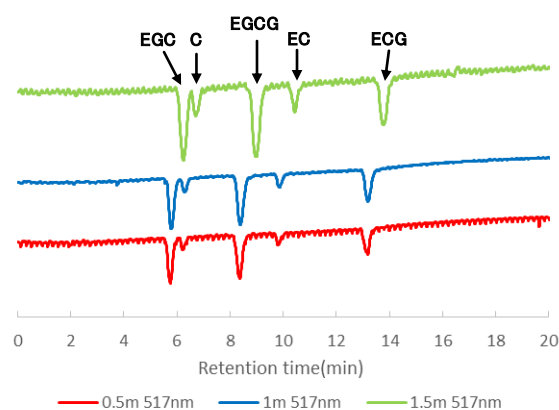


図 3 カテキン類標準品のクロマトグラム (517nm)

5.2 茶抽出液の分析

有機溶媒抽出液と熱水抽出液の分析結果をそれぞれ図 4 と図 5 に示し、標準品の保持時間から同定できたピークについては成分名を表記した。図から熱水抽出液は、有機溶媒抽出液にはないピークを有し、それぞれ 517nm に反転ピークをもつことから抗酸化性を有することが確認できた。保持時間 14.6 分や 15.8 分のピークのように 231nm の吸光度があまり高くなくても、分離できていれば抗酸化性を示す反転ピークを検出できたことから、感度も充分であると考えられる。以上のことから、熱水抽出物の成分分離と同時に、分離成分の抗酸化性を検出する方法として本手法が有効であることが分かった。

表 1 コイルの長さによる抗酸化性の検出感度の変化

	コイル長0.5m			コイル長1m			コイル長1.5m		
	S_{231nm}	S_{517nm}	R	S_{231nm}	S_{517nm}	R	S_{231nm}	S_{517nm}	R
EGC	3495166	1166952	0.33	2895981	1389569	0.48	3365827	2364433	0.70
C	3472680	155166	0.04	2730817	263980	0.10	3154513	708777	0.22
EGCG	3695022	1239264	0.34	3046543	1535573	0.50	3617227	-	-
EC	1729896	247324	0.14	1460378	318055	0.22	1638510	906444	0.55
ECG	3820641	656763	0.17	3042235	1002593	0.33	3673065	1908938	0.52

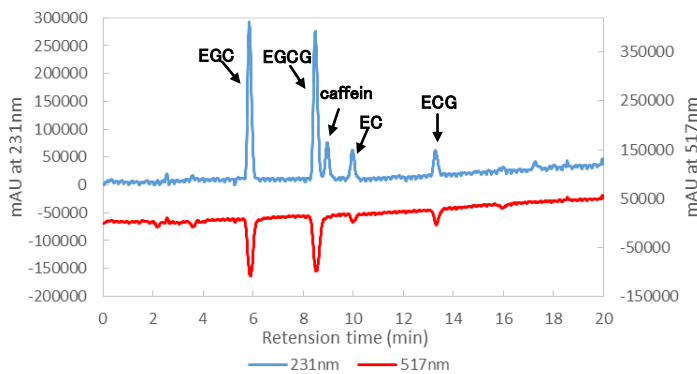


図4 有機溶媒抽出液のクロマトグラム

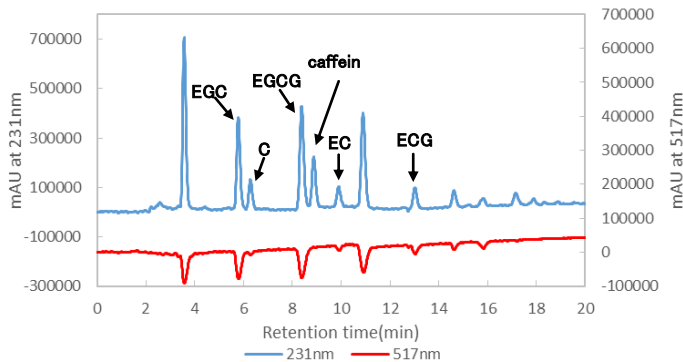


図5 熱水抽出液のクロマトグラム

5) アショク・クマル・サーカー, 柚木崎千鶴子, 小林美穂, 小窪正人, 岡部玲二, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告 2004, 49, 95-101.

6. 結論

本研究では、茶葉の熱水抽出液中において、エピマー化や重合により生成すると考えられる未同定の抗酸化性成分について、ポストカラム DPPH-HPLC 法により分離と同時に抗酸化性の有無を判断できるか検討を行った。その結果、以下に示す知見を得た。

- 1) 試料成分ごとの分離を維持しつつ、分離成分と DPPH の反応時間を最大限に得られるコイル長を選択するために、3つのコイル長で比較したところ、適切なコイル長を決定できた。
- 2) 熱水抽出液中の未同定成分について、ポストカラム DPPH-HPLC 法により、抗酸化性の有無を判断できた。

7. 引用文献

- 1) 佐野満昭, 日本調理化学会誌 2007, 40, 4, 223-230.
- 2) 沖智之, 食品機能性評価マニュアル集第II集, 日本食品化学工学会, 2008, 71-78.
- 3) Bandoniene, D.; Murkovic, M. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2482-2487.
- 4) 久本雅嗣, 市川茉莉枝, 依田諭, 小林浩武, 奥田徹, *J. ASEV Jpn.* **2011**, *22*, 3-9.