

加圧熱水を用いたさつまいも茎葉からの有用成分抽出

安藤浩毅*, 古川郁子*, 西元研了*

Extract of Valuable Components from Stems and Leaves of Sweet Potato Using Hot-Compressed-Water

Hiroki ANDO, Ikuko FURUKAWA and Kenryo NISHIMOTO

さつまいも茎葉に含まれる生体に有用なポリフェノールについて、加圧熱水抽出の手法を用いてポリフェノールの抽出効率および抽出物に含まれる新規成分の探索を試みた。その結果、加圧熱水抽出によりポリフェノールは乾燥茎葉 1 g 当たり 47 ~ 64mg (クロロゲン酸相当量) 得られ、80vol% アルコールで抽出される量の 35mg より大きな値を示した。また、HPLC によるポリフェノールの詳細な分析を行った結果、加圧熱水抽出物に未知成分が検出され、それらは LC/MS/MS の分析で、ポリフェノールの一種であるクロロゲン酸の異性体であることがわかった。

Keyword : Stem and leaf of sweet potato, Polyphenol, Extract, Hot-compressed-water

1. 緒言

さつまいもは鹿児島県の基幹作物の 1 つであり、年間約 40 万トン生産されている。その一方で、食料にならない部位 (茎葉) も、食用部 (根塊) の 7 ~ 8 割発生し、茎葉の一部は家畜の飼料として利用されているが、そのほとんどが農地還元 (畑への鋤き込み) され、十分に有効活用されていない。

近年、さつまいもの葉には抗酸化活性を有するポリフェノール類 (乾燥粉末 100 g 当たり 2 g ~ 18 g 含まれる) に、抗腫瘍作用、抗糖尿病作用、抗高血圧作用等の機能性が見いだされ¹⁾、さつまいも由来のポリフェノールを活用した用途開発と共に大量抽出方法も検討されている²⁾³⁾。特にさつまいものポリフェノールは、図 1 に示されるようなカフェ酸とキナ酸が結合したカフェ酸誘導体が特徴的であり、3,4,5-トリカフェオイルキナ酸を除けば、品種、部位にかかわらず存在する¹⁾。

一般的にポリフェノールの抽出には、含水アルコールや塩酸性アルコール、その他有機溶剤等が用いられているが、食品等へ応用する場合はその安全性を考慮して主に水や熱水 (常圧)、エタノール等が用いられる。一方、加圧熱水⁴⁾ (100 ~ 300 程度の蒸気を伴わない熱水) は、その温度、圧力を制御することにより、水やアルコールでは抽出されない成分が抽出され、また、熱反応によって新規な成分が生成することも期待される。

そこで本研究では、加圧熱水処理技術をさつまいもの茎や葉に適用し、加圧熱水での有用成分の抽出効果の検討および新規成分の探索を行った。

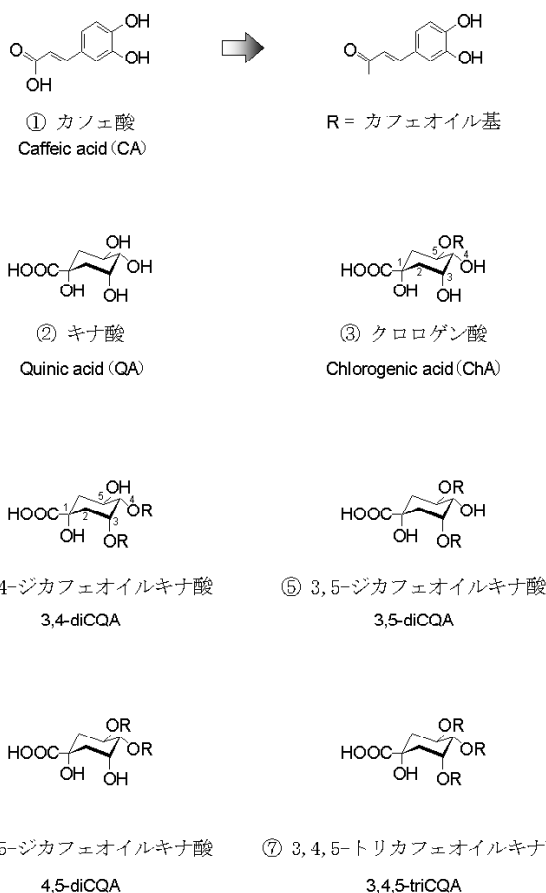


図 1 さつまいも茎葉に含まれるカフェ酸誘導体類

2. 実験方法

2.1 供試試料

試験に用いたさつまいも茎葉は、鹿児島県農産物加工研究指導センターで栽培されたコガネセンガンを使用した。さつまいもを収穫する前の地上部の茎葉をすべて回収し、洗浄、破碎、凍結乾燥後、さらに 2 mm 以下に粉碎したものを試験に供した。

* 化学・環境部

表1 各種抽出条件

	加圧熱水	オートクレーブ	熱水	80vol%アルコール水溶液 (80%-EtOH, 80%-MeOH)
抽出溶媒	水	水	水	アルコール：水(80：20)
温度()	140,150,160,170,180	121	97 以上	常温
圧力(MPa)	2.5	0.12	常圧	常圧
仕込量(g)	2.1	1.0	1.0	1.0
抽出液量(mL)	300	40	40	200
	(10mL/min×30min)	(50) ^{a)}	(50) ^{a)}	(100mL×2回)
抽出時間(min)	30	60	30	120
		(10) ^{b)}		(60min×2回)

a) メスアップ量, b) 121 に達してからの時間

2.2 ポリフェノールの抽出方法および抽出条件

加圧熱水による抽出効果を比較するため、表1の条件でさつまいも茎葉からポリフェノール成分の抽出を行った。加圧熱水による抽出は既報⁴⁾に従い、所定量のサンプル(凍結乾燥したさつまいも茎葉の粉碎物、2mm以下)を28mL容の固定床型反応器⁵⁾(23.5mm×65mm, 5μmの焼結フィルターでサンプルを固定)に仕込み、140~180の加圧熱水を反応器に通水させる熱水流通式にて抽出を行った。抽出液は流出開始から5分間隔で2回(Fr.1, Fr.2), 続いて20分間(Fr.3)の合計3つのフラクション(抽出時間:計30分)に分けて抽出液を回収し、各種分析に供した。また、加圧熱水抽出の比較対照として、市販のオートクレーブを用いた処理(121の飽和蒸気圧で加圧されるが、加圧熱水処理に比べ低圧である)および熱水抽出(常圧下で、97以上の沸騰水中で加熱)を行った。

なお、抽出効率の基準値となるポリフェノール類(カフェ酸誘導体類)の抽出方法は、エタノール(EtOH)もしくはメタノール(MeOH)の80vol%アルコール水溶液(以下、有機溶媒とする)による抽出とし、次の手順で調整した。1.0gの試料に100mLの有機溶媒を加え、常温で60分間攪拌しながら抽出し、固液分離後、ろ液を除いた固形分にさらに同量の有機溶媒を加えて抽出した。抽出したろ液は混合してエバポレーターで40mLまで濃縮後、40mLの洗浄水と共に分液ポートに移し替え、40mLのヘキサンを加えて振盪攪拌後、一昼夜静置させて二層に分離した。水層部を取り出し、超純水で100mLにメスアップしたものを、さつまいも茎葉から得られるポリフェノールの基準値となる抽出液とした。

ここで、本抽出実験および以後の分析に使用した試薬は、すべて試薬特級レベルのものを使用した。

2.3 分析および測定方法

2.3.1 加圧熱水抽出物の収率

加圧熱水に可溶化して得られたさつまいも茎葉の抽出物は、抽出液の一部を凍結乾燥して得られた固形物濃度と各フラクションの抽出液重量から、反応器に仕込んだ乾燥茎葉基準の抽出物収率を求めた。また、抽出残渣は100で一昼夜乾燥し、その重量から抽出残渣を求めた。

2.3.2 総ポリフェノール

ポリフェノールの定量はFolin-Ciocalte法⁶⁾に準じて行った。すなわち、0.2mLの試料に2倍希釈したFolin-Ciocalte試薬(和光純薬工業(株)製)を1mL加え、さらに10%の炭酸ナトリウムを1mL加えてよく攪拌し、30の水浴中で20分反応させた後、765nmの吸光度を分光光度計(UV2500PC, (株)島津製作所製)で測定した。ポリフェノールの含量は、標準試薬のクロロゲン酸を指標として、1gの乾燥茎葉に含まれるクロロゲン酸相当量として表した。

2.3.3 カフェ酸誘導体類

ポリフェノールの一種であるカフェ酸誘導体類の分析はマルチUV検出器を有する高速液体クロマトグラフ(HPLC, Agilent 1100 series, アジレント・テクノロジー(株)製)を用いて測定を行った。カラムはChromatorex ODS(4mm×250mm, 富士シリシア化学(株)製)を用い、カラムオーブンの温度は35、流速は0.75mL/min, サンプル注入量は20μLとした。分離条件は、2液の1段階グラジエント、すなわち、A液を10vol%アセトニトリル水溶液-0.1vol%TFA(トリフルオロ酢酸)、B液を30vol%アセトニトリル水溶液-0.1vol%TFAとし、0-40分:100%-0%A, 40-50分:0%A, 50-60分:100%Aとした。溶出成分は、保持時間と360nmのUVスペクトルを標準試薬と比較することにより同定した。カフェ酸誘導体類の定量には、市販の標準試薬および(独)農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センターより提供された標準サンプルを用い、内部標準法(I.S.:フェルラ酸, 25.6mg/LのI.S.をサンプルに10%添加)にて測定を行った。

2.4 未知成分の分取

未知成分の分取は、フラクションコレクター (Advantec SF-3120, アドバンテック東洋(株)製) を接続した前述のHPLCを用い、1成分当たり50~80mLを回収し、エバポレーターで濃縮、凍結乾燥により固形分を1~2mg程度を得た。

分取カラムはXBridge Prep C18 (10mm×250mm, 日本ウォーターズ(株)製) を用い、カラムオープンの温度は35℃, 流速は3.0mL/min, サンプル注入量は100μLとした。

分取条件は、分析条件と同様、2液(AおよびB)の1段階グラジエントとし、時間短縮のため、0-20分:100%-45%A, 20-42分:0%A, 42-50分:100%Aとした。

2.5 未知成分の同定

分取で得られた固形分を1mg/L程度の濃度になるようにアセトニトリルに溶解し、LC/MS/MS (API2000, アプライドバイオシステムズ社製) にて測定した。

分析カラムはInertsil ODS-3 (2.1mm×150mm, ジーエルサイエンス(株)製) を用い、カラムオープンの温度は40℃, 流速は0.2mL/min, サンプル注入量は10μLとした。分離条

件は、2液の1段階グラジエント、すなわち、A液をアセトニトリル、B液を0.1vol%ギ酸水溶液とし、0-3分:5%A, 3-23分:5%-95%A, 23-43分:95%-5%Aとした。

なお、抽出溶媒、分析・分取等に用いたすべての試薬はHPLC用もしくは試薬特級レベルのものを使用した。

3. 結果及び考察

3.1 物質収支

反応器入り口の温度変化を図2に、加圧熱水抽出物の収率および抽出残渣の結果を表2に示す。この結果から、Fr.1はまだ所定温度に達していないが、加圧熱水の通水開始からはじめの5分間で、さつまいも茎葉の20~30wt%の抽出物が得られ、所定温度に達してからFr.3でさらに13~33wt%の抽出物が得られた。全体的に加圧熱水温度が高くなるに従い、抽出物収率(Fr.1~3の小計)は高くなる傾向を示し、最終的にさつまいも茎葉から5~6割の加圧熱水抽出物が得られることがわかった。

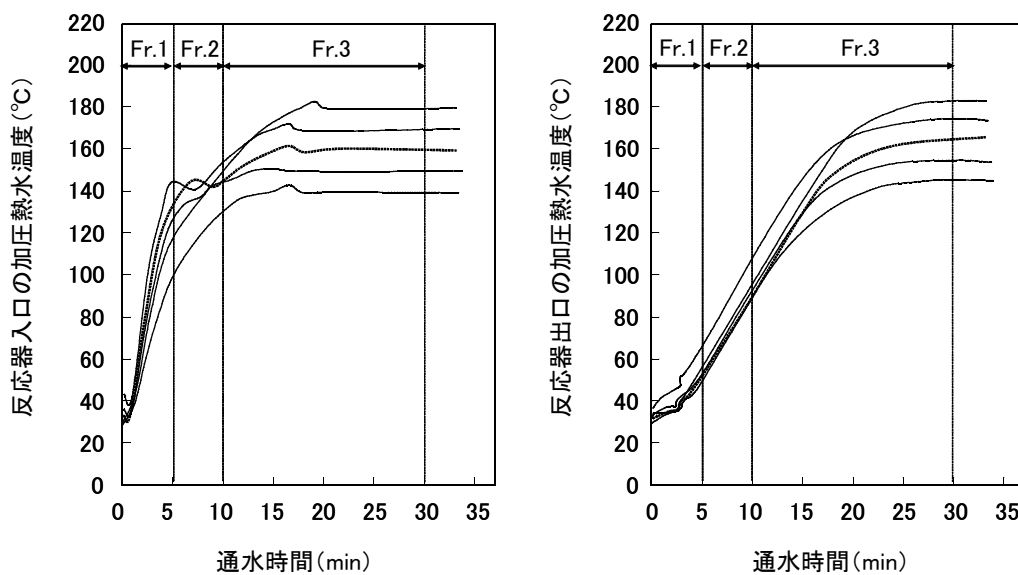


図2 反応器入り口の温度変化

表2 加圧熱水抽出物の収率および抽出残渣

単位: wt%

温度	140	150	160	170	180
Fr.1	29.1	25.8	23.1	20.8	19.8
Fr.2	5.3	6.1	7.6	10.4	7.8
Fr.3	12.9	18.2	26.3	24.9	33.2
小計	47.2	50.1	57.0	56.1	60.8
残渣	47.9	43.7	40.4	35.6	32.3
合計	95.2	93.8	97.4	91.7	93.1

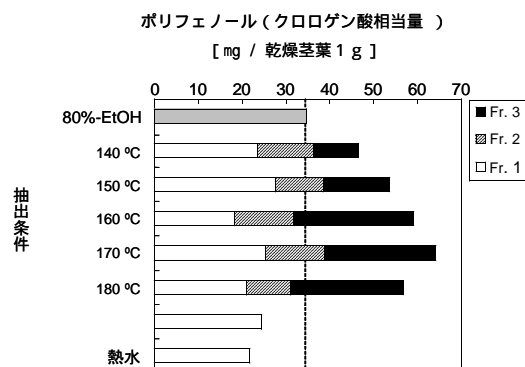


図3 乾燥茎葉1g当たり抽出されるポリフェノール量

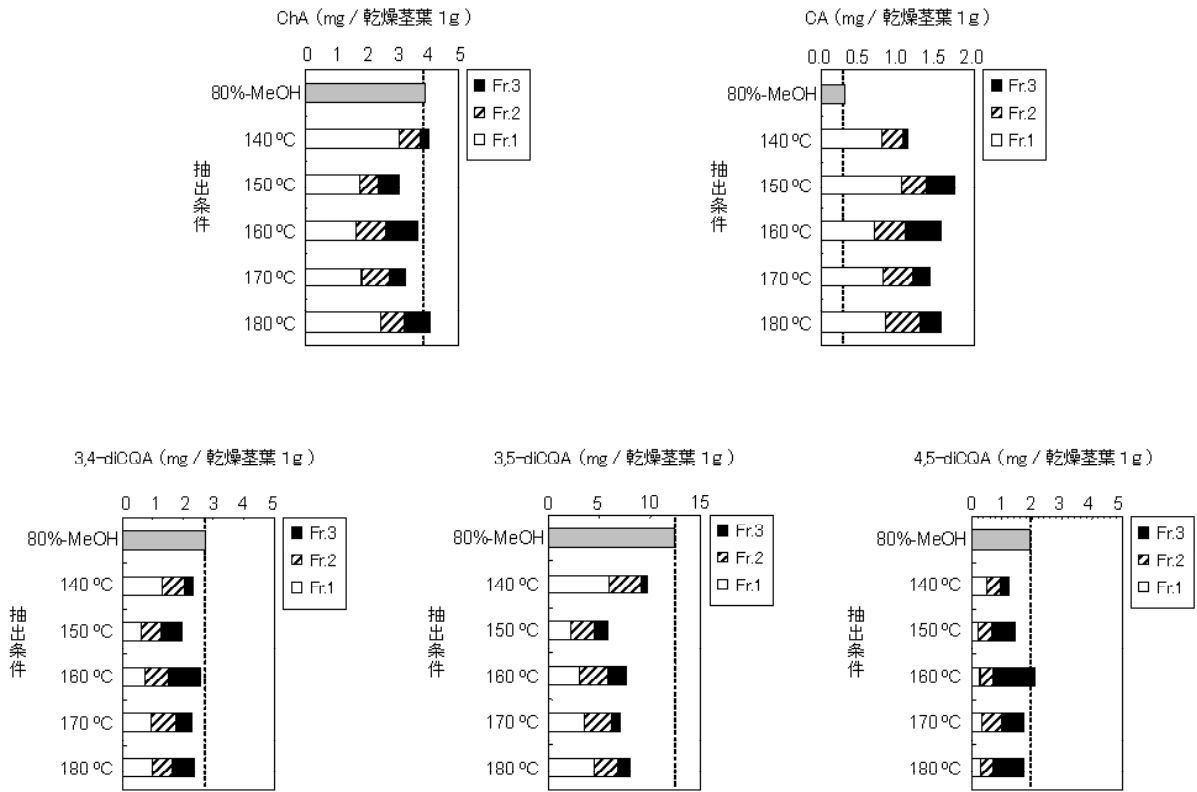


図4 加圧熱水にカフェ酸およびカフェ酸誘導体の抽出量

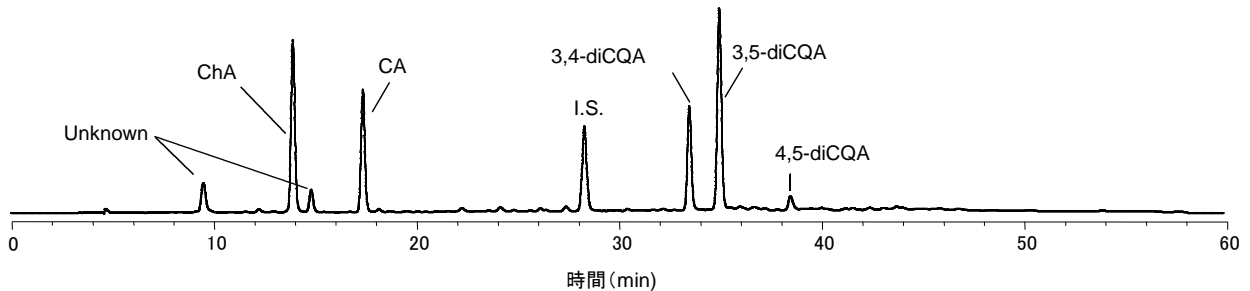


図5 HPLCクロマトグラム

3.2 ポリフェノールの抽出効果

各種抽出方法による総ポリフェノール量をクロロゲン酸量として図3に示す。

この結果から、ポリフェノール類は140～180の加圧熱水により乾燥茎葉1g当たり47～64mg(5～6wt%)得られ、有機溶媒(80%-EtOH)で抽出される量の35mgより大きな値を示した。また、オートクレーブ処理および熱水抽出でも有機溶媒の6～7割のポリフェノール類が抽出された。この結果から、アルコールなどの高価な有機溶媒を用いなくても熱水のみでポリフェノール類の抽出は可能であることが示された。

3.3 カフェ酸およびカフェ酸誘導体の抽出効果

ポリフェノールについてさらに詳細に調べた結果を図4および図5に示す。HPLCの結果から、カフェ酸(CA)、クロロゲン酸(ChA)、3種のジカフェオイルキナ酸(diCQA)が検

出され、3,4,5-トリカフェオイルキナ酸については、本分析条件では検出されなかった。

加圧熱水によるカフェ酸誘導体類の抽出効果としては、乾燥茎葉1gから平均1.5mgのCAが得られ、80%-MeOH抽出の0.2mgに比べて5～8倍に増加した。一方、diCQAは全体的に減少した。これは、加水分解によりカフェオイル基が脱離したためと考えられる。ChAは平均3.6mg得られ、140～180の範囲でばらつきはあるが、特に加圧熱水抽出の温度による影響は見られなかった。また、CAと同様に増加する2種類の未知成分(Unknown)が確認された。

3.4 未知成分の分析

HPLCのUV検出器を325nmの固定波長で測定した場合、未知成分は2本検出されたが、分取用のカラムで未知成分の分取条件を検討した結果、図5に示される10分前後の保持時間に検出されるピークは更に2つの成分に分かれた。そ

ここで、これら3つの未知成分について分取し、LC/MS/MSのMRMモードで分析を行った。その結果、いずれの成分もクロロゲン酸(5-CQA)と同じQ1(353.0)Q3(190.9)及びQ1(353.0)Q3(190.4)のイオンが検出され、クロロゲン酸の保持時間11.91分に対し、Unknown1は10.8分、Unknown2は11.76分、Unknown3は12.12分の保持時間に検出された(図6)。この結果から、未知成分はいずれもクロロゲン酸の異性体であり、1-CQA、3-CQAおよび4-CQAのいずれかであることが推定された。これらの異性体は、インスタントコーヒーに含まれており⁷⁾、また、クロロゲン酸のアルカリ処理でも異性体が生成する^{8),9)}ことは知られているが、加圧熱水抽出の抽出過程においてもクロロゲン酸の異性体が生成していることが考えられた。

4. 結 言

さつまいもの茎葉から生体に有用なポリフェノールの抽出方法として、新たに加圧熱水法を検討した。その結果、次のことが明らかになった。

- (1)加圧熱水抽出法は、従来から行われていた有機溶媒(80%-EtOH)抽出方法と遜色のない抽出効率(クロロゲン酸基準として)であることがわかった。
- (2)加圧熱水によりカフェ酸の抽出量は、有機溶媒(80%-MeOH)抽出時の5~8倍に増加し、一方、カフェ酸誘導体の3種のジカフェオイルキナ酸は有機溶媒抽出に比べほぼすべて減少した。これは、ジカフェオイルキナ酸が加水分解されたことによると考えられる。クロロゲン酸については、特に加圧熱水抽出による影響は見られなかった。
- (3)水熱反応により新たに生成する成分が示され、それらはポリフェノール的一种であるクロロゲン酸の異性体であることが推定された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、原料のさつまいも茎葉を提供していただいた鹿児島県農産物加工研究指導センターの嶋田義一主任研究員(現 鹿児島地域振興局農林水産部日置市駐在)、カフェ酸誘導体類の標準試料を提供していただいた(独)農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター都城研究拠点の吉元誠室長(現 鹿児島女子短期大学教授)および石黒浩二主任研究員(現 北海道農業研究センター)、また未知成分の分析を行っていただいた鹿児島県環境保健センターの下堂蘭栄子研究専門員、岩屋あまね主任研究員に感謝の意を表します。

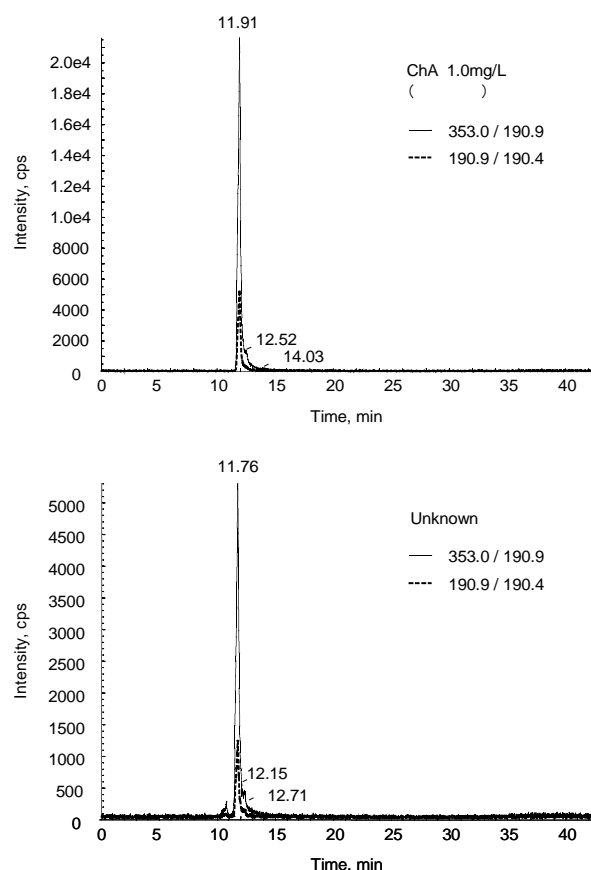


図6 LC/MS/MSの分析結果(一例)

参 考 文 献

- 1)吉元誠: 食品と技術, 10-18(2008)
- 2)嶋田義一, 松本順: 鹿児島県農産物加工研究指導センター流通と利用に関する試験成績書, 84-88(2004)
- 3)嶋田義一, 松本順: 鹿児島県農産物加工研究指導センター流通と利用に関する試験成績書, 72-90(2005)
- 4)安藤浩毅, 古川郁子, 神野好孝, 坂木剛, 上村芳三, 幡手泰雄: 鹿児島県工業技術センター研究報告, 14, 45-51(2000)
- 5)安藤浩毅, 森田慎一, 古川郁子, 神野好孝, 坂木剛, 廣末英晴: 木材学会誌, 49, 293-300(2003)
- 6)日本食品科学工学会, 食品分析研究会: “新・食品分析法〔 〕”, 光琳(2006)p68
- 7)L.C.Trugo, R.Macrae: Analyst, 109, 263-266(1984)
- 8)L.Nagels, W.von Dongen, J.Brucker, H.Pooter: J. Chromatogr., 187, 181-187(1980)
- 9)渡辺悟, 三沢尚子, 小澤哲夫: 聖徳栄養短期大学紀要, 31, 7-11(2000)