

クロマトグラフィー分析によるウコンの分類

- 高速液体クロマトグラフィー分析条件の検討 -

照屋正映

健康食品原料として取り扱われる県内産ウコンとその他の海外産ウコンなどをクルクミノイドとその他ウコンに含まれる多くの成分のクロマトグラムパターンにより分類し、その分類されたグループと機能性との比較検討を目的に、ウコン精油、熱水抽出エキス的高速液体クロマトグラフィー分析における最適な分析条件の検討を行い、それぞれの最適な分析条件を確立した。

これにより、健康食品等の原料となるウコンのクロマトグラフィー分析条件を確立し、分析することが可能となったことから、多数のサンプルを分析してそのクロマトグラムのパターンを分類することにより、化学的根拠に基づきウコン原料を差別化することが可能になると考えられる。

1 はじめに

多くの場合、健康食品に用いられる原料植物は複数の生理作用を有し、またその作用が複数の成分の関与により発現すると考えられている。従って、原料植物を利用する際に、化学的に品質を評価する場合、一成分のみを指標とした評価が適切でない場合があることが考えられ、含まれる成分を総合的に評価することが必要である。

県内における健康食品素材として大きな割合を占めているウコンは、その有用成分としてクルクミンがよく知られており、その生理作用としては利胆作用や抗菌作用、消炎作用が知られている。ウコンにはさらに数%の精油成分も含まれており、これらもまた芳香性健胃としての作用や、抗菌作用などが知られている¹⁾。このことから、化学的にウコンの品質を評価する場合、一成分のみを指標とした評価が適切でない場合があることが考えられ、含まれる成分を総合的に評価することが必要である。

こうした複数の成分を捉えた評価法としては、児嶋らによるウコン属植物間（ウコン、キョウオウ、クスリウコンなど）の精油成分によるガスクロマトグラムパターンや色素成分としてクルクミノイド（Curcumin, Monodemethoxycurcumin, Bisdemethoxycurcumin）のHPLCクロマトグラムパターンによる分類や^{2,3)}、上原らの市場品ウコン精油成分のガスクロマトグラムパターンとクルクミノイドのHPLCクロマトグラムパターンによる分類の報告がある⁴⁾。

県内におけるウコンの商品形態は、乾燥スライス、粉末、錠剤、エキス、お茶など様々な加工形態がある。さらに、原料としてのウコンは、県内産はもとより、中国、ミャンマー、タイ、ベトナム、台湾からの輸入品もあり、その品種・系統も様々である。そこで本研究では、健康食品原料として取り扱われる県内産ウコンとその他の海

外産ウコンなどをクルクミノイドとその他ウコンに含まれる多くの成分のクロマトグラムパターンにより分類し、その分類されたグループと機能性との比較検討を目的として、ウコン精油、熱水抽出エキス的高速液体クロマトグラフィー分析における最適な分析条件の検討を行った。

2 実験方法

2-1 装置

乾燥ウコンの粉碎には、カッター式粉碎器IKAのMF10ベーシック（メッシュサイズ：1.0mm）を用いた。

HPLC分析には、Watersの高速液体クロマトグラフィー装置Alliance（送液部：2690、検出器：996、データ処理：Empower）を用いた。

2-2 試薬及び試料

抽出溶媒には超純水（上水を蒸留、脱イオン後0.20μmメンブレンフィルター濾過）を用いた。

HPLC分析用の溶媒としては、アセトニトリル（和光純薬工業、高速液体クロマトグラフィー用）、ギ酸（和光純薬工業、高速液体クロマトグラフィー用）、超純水を使用した。

2-3 試料の前処理

生根茎は、洗浄後、スライスし60℃で温風乾燥した後、ガラス製の密封瓶に保管し、必要に応じてカッター式粉碎器で粉碎し乾燥粉末とした。スライス乾燥物として入手したのもカッター式粉碎器で粉碎し、乾燥粉末とした。乾燥粉末として提供を受けたものはそのまま用いた。

2-4 抽出エキスの調製

熱水抽出エキスの調製は、試料乾燥粉末の重量に対して10倍量の水を加え、沸騰水浴中で30分間抽出を行った。抽出後、室温まで放冷した後、3,000rpmで30分間、室温で遠心分離を行い、その上清を再び20、6,000Gで30分間高速遠心分離を行った。上清を0.20μmフィルターで濾過したものを熱水抽出エキスとした。

2-5 精油の調製

精油の調製は、日本薬局方精油定量法に準じて水蒸気蒸留により行った。ただし、精油定量器へのキシレンの添加は省略した。試料乾燥粉末50gを硬質ガラスフラスコに入れ、500mLの水を加えた後、あらかじめ水を基準線まで加えた精油定量器および還流冷却器を装着し、油浴中140で加熱し、沸騰させた。5時間沸騰を続けた後、加熱をやめて室温まで放冷し、精油を得た。精油は、分析に用いるまでガラス製バイアルで冷蔵保存とした。また、精油100μLをエタノール1mLに溶解し、これを精油溶液として分析に用いた。

2-6 精油のHPLC分析条件の検討

2-6-1 分析カラムの検討

精油のHPLC分析条件を確立するため、分析に適したカラムの検討を表1、2に示す条件で行った。

表1 HPLC分析条件

流速	1mL/min
カラム温度	35
検出	フォトダイオードアレイ検出器 210-800nmマックスプロット

表2 HPLC分析溶媒条件

	水	アセトニトリル
初期値	80%	20%
25分	0%	100%
28分	0%	100%
30分	80%	20%
40分	80%	20%

2-6-2 分析溶媒初期条件の検討

前節の実験結果より、分析カラムにC18系カラムを選択し、次に分析溶媒の初期条件の検討を表3に示す条件で行った。

表3 HPLC分析溶媒条件

	20%アセトニトリル		40%アセトニトリル		60%アセトニトリル		80%アセトニトリル	
	水	アセトニトリル	水	アセトニトリル	水	アセトニトリル	水	アセトニトリル
初期値	80%	20%	60%	40%	40%	60%	20%	80%
25分	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%
28分	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%

2-6-3 分析溶媒グラジエント条件の検討

前節の実験結果より、分析溶媒初期条件を60%アセトニトリルとし、次に分析時間の短縮を目的にグラジエント条件の検討を表4に示す条件で行った。

表4 HPLC分析溶媒グラジエント条件

	条件1	条件2	条件3	条件4
60%アセトニトリル	0分	0分	0分	0分
100%アセトニトリル	25分	20分	15分	10分
100%アセトニトリル	28分	23分	18分	13分

2-7 熱水抽出エキスのHPLC分析条件の検討

2-7-1 分析溶媒条件の検討

熱水抽出エキスのHPLC分析条件を確立するため、溶媒条件の検討を表5、6に示す条件で行った。

表5 HPLC分析条件

カラム	Waters Symmetry C18 3.5 μm, 4.6 x 100mm
流速	1mL/min
カラム温度	35
検出	フォトダイオードアレイ検出器 254-800nmマックスプロット

表6 HPLC分析溶媒条件

	条件1			条件2			条件3			条件4	
	水	メノール	1%ギ酸	水	メノール	水	アセトニトリル	1%ギ酸	水	アセトニトリル	
初期値	100%	0%	10%	90%	0%	100%	0%	10%	90%	0%	
5分	100%	0%	10%	90%	0%	100%	0%	10%	90%	0%	
24分	0%	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	
28分	0%	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	

2-7-2 分析カラムの検討

前節の実験結果より、分析溶媒条件を表7のとおりとし、次に分析カラムの検討を行った。比較検討するカラムは、比較的親水性化合物の分析に有効とされているYMC-Pack ODS-AQを使用した。

3 実験結果及び考察

3-1 精油のHPLC分析条件の検討

3-1-1 分析カラムの検討

2-6-1節に示す条件で行った分析のHPLCクロマトグラムを図1に示す。C18系のカラムにおいて、比較的溶出の早い成分の分離パターンが良好で、またサンプル間におけるクロマトパターンの差が明確に現れていることから、分析カラムとしてC18系のカラムを選択した。

表7 HPLC分析溶媒条件

	1%ギ酸	水	アセトニトリル
初期条件	10%	90%	0%
5分	10%	90%	0%
24分	0%	0%	100%
28分	0%	0%	100%

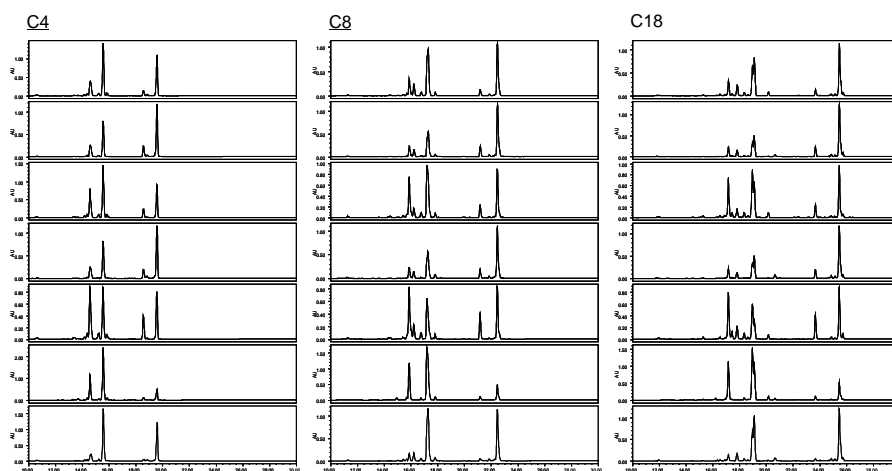


図1 異なるカラムでの精油HPLC分析クロマトグラム

3-1-2 分析溶媒初期条件の検討

2-6-2節に示す条件で行った分析のHPLCクロマトグラムを図2に示す。アセトニトリル初期濃度20%、40%、60

%の条件において良好なクロマトパターンを示していることから、短時間で分析の行える60%アセトニトリルの条件を選択した。

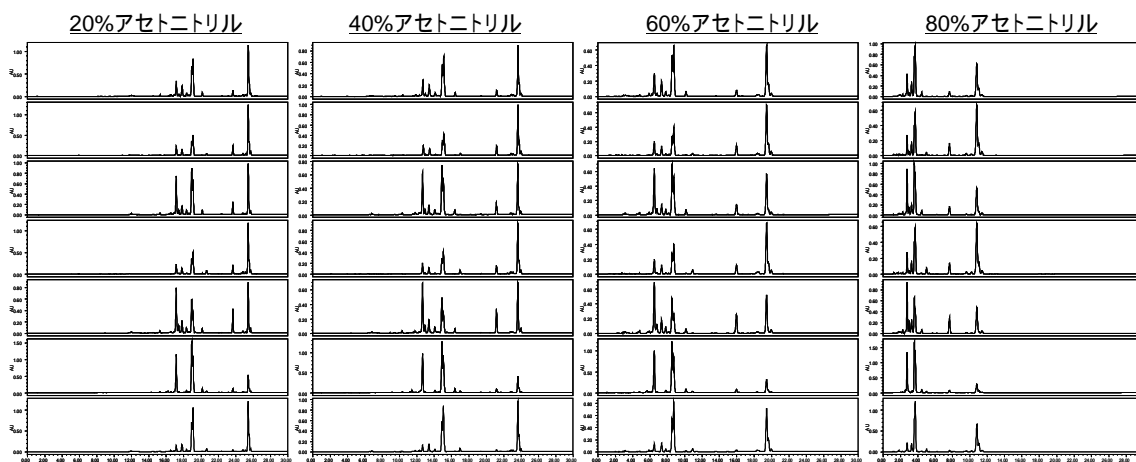


図2 異なるアセトニトリル初期濃度での精油HPLC分析クロマトグラム

3-1-3 分析溶媒グラジエント条件の検討

図2において、0分から6分、10分から20分の間において、特に目立ったピークが認められないことから、グラジエント条件を変えて分析を行った。結果のHPLCクロマトグラムを図3に示す。100%アセトニトリルまでの到達時間が10分の条件においても良好なクロマトグラムが得られた。

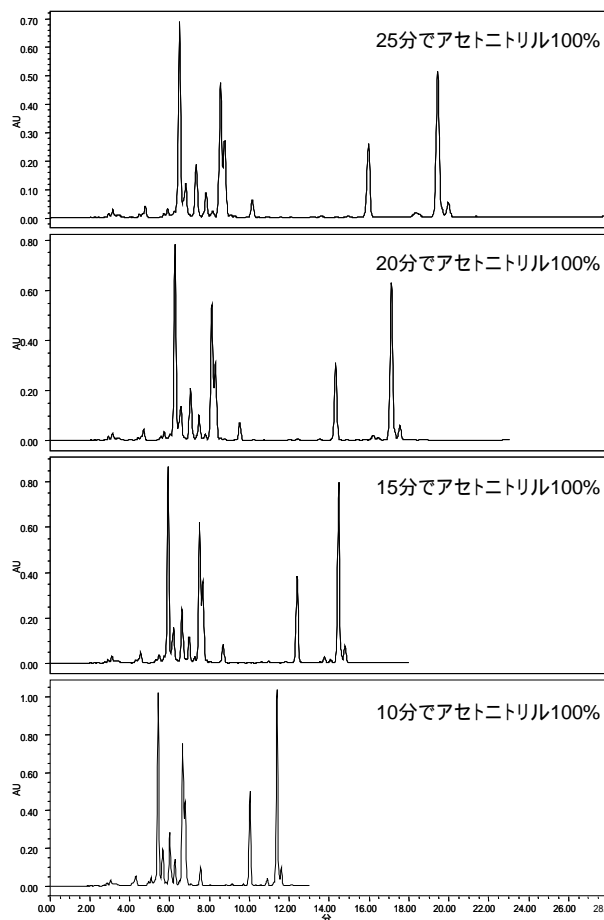


図3 異なるアセトニトリル100%到達時間での精油HPLCクロマトグラム

3-2 熱水抽出エキスのHPLC分析条件の検討

3-2-1 分析溶媒条件の検討

2-7-1節に示す条件で行った分析溶媒条件検討のHPLCクロマトグラムを図4に示す。17分付近のクルクミノイドのピークがアセトニトリル溶媒系においては3つに分かれて良好な分離が見られ、また酸を添加した条件4においてこれらのピークの分離がよいことから、溶媒条件として条件4を選択した。

3-2-2 分析カラムの検討

2-7-2節に示す条件で行った分析カラム検討のHPLCクロマトグラムを図5に示す。12分付近におけるピーク分離がYMC-Pack ODS-AQを使用した分析で良好なことから、分析カラムとしてYMC-Pack ODS-AQを選択した。

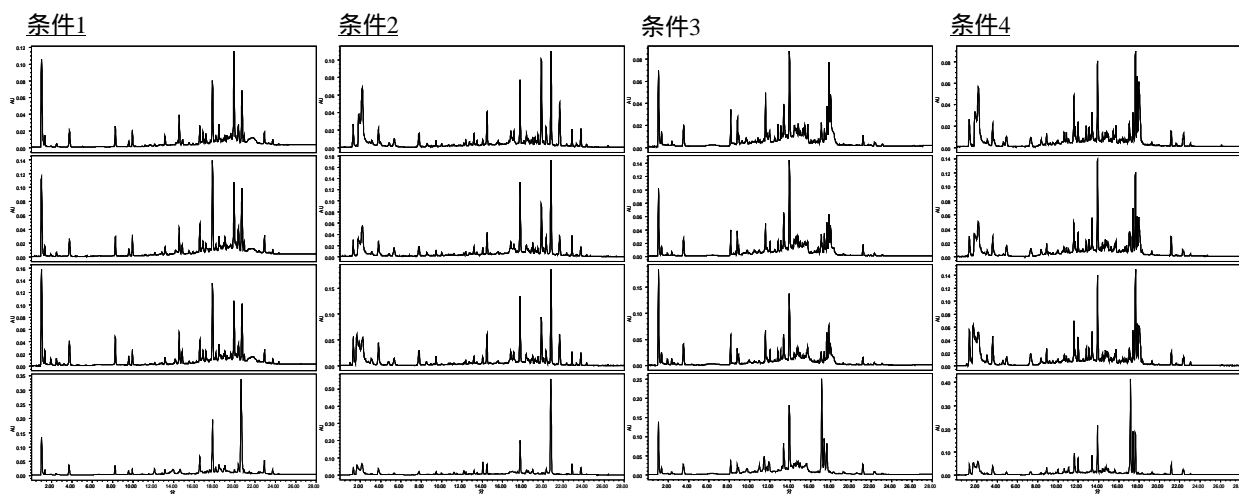


図4 異なる溶媒条件でのHPLCクロマトグラムの検討

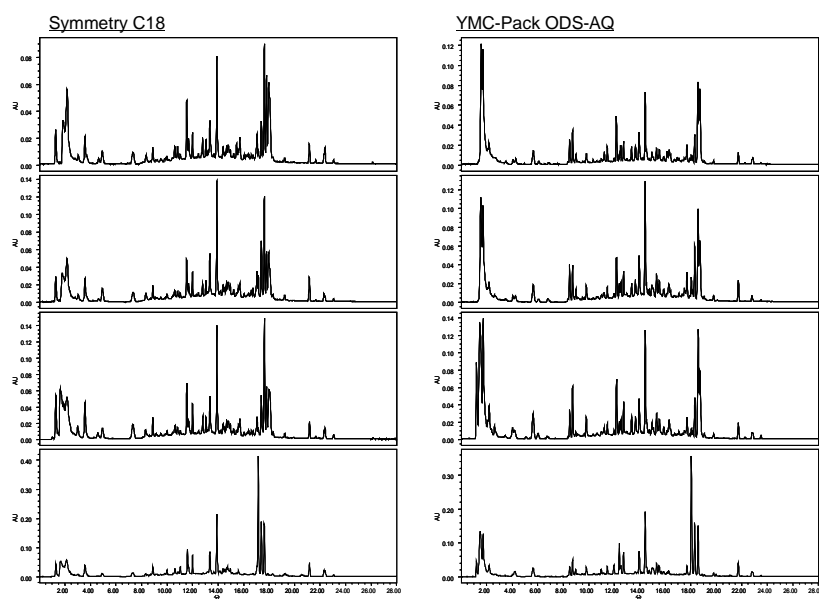


図5 異なるカラムでの熱水抽出エキスHPLC分析クロマトグラム

4 まとめ

ウコン精油のHPLC分析について、カラム、溶媒条件を検討した結果、最適な分析条件を表8、9のとおりとした。

表8 ウコン精油のHPLC分析条件

カラム	Waters Symmetry C18 3.5 μm, 4.6 x 100mm
流速	1mL/min
カラム温度	35
検出	フォトダイオードアレイ検出器 210-800nmマックスプロット

表9 ウコン精油のHPLC分析溶媒条件

	水	アセトニトリル
初期値	40%	60%
10分	0%	100%
13分	0%	100%

表10 ウコン熱水抽出エキスのHPLC分析条件

カラム	YMC-Pack ODS-AQ 5 μm, 4.6 x 100mm
流速	1mL/min
カラム温度	35
検出	フォトダイオードアレイ検出器 254-800nmマックスプロット

表11 熱水抽出エキスのHPLC分析溶媒条件

	1%ギ酸	水	アセトニトリル
初期値	10%	90%	0%
5分	10%	90%	0%
24分	0%	0%	100%
28分	0%	0%	100%

また、ウコン熱水抽出エキスのHPLC分析について、カラム、溶媒条件を検討した結果、最適な分析条件を表10、11のとおりとした。

これにより、健康食品等の原料となるウコンのクロマトグラフィー分析条件を確立し、分析することが可能となったことから、多数のサンプルを分析してそのクロマトグラムのパターンを分類することにより、化学的根拠に基づきウコン原料を差別化することが可能になると思われる。

謝辞

本研究は、平成16、17年度健康食品品質向上総合対策事業に採択された『健康食品原料の機能成分向上技術および安全生産技術の開発』の中のサブテーマとして行いました。本共同研究事業に参加できる機会を与えていただいたプロジェクトリーダーの安仁屋洋子琉球大学医学部教授をはじめ以下の共同研究者の方々および研究管理・コーディネートを行っていただいた財団法人南西地域産業活性化センターの方々に感謝いたします。

外間 数男 沖縄県農業試験場名護支場場長
石嶺 行男 琉球大学農学部教授
伊良波幸和 沖縄県農業試験場名護支場
吉武 均 沖縄県農業試験場流通加工室長

また、ウコンサンプルを提供いただいた方々に感謝いたします。

参考文献

- 1) 中薬大辞典 (1998)小学館
- 2) 児嶋脩、八沢麻貴子、豊田祥広、梁井哲也、斎木保久、エンダン・ハナニ 日本生薬学会第47回年会講演要旨集、159(2000)
- 3) 児嶋脩、冷水恵己子、小島壮、山本泰子、富永英夫、佐藤繁嘉、Nguyen Xuan Dung、斎木保久 日本生薬学会第51回年会講演要旨集、72(2004)
- 4) 上原真一、安田一郎、竹谷孝一、糸川秀治 生薬学雑誌、46(1)、55-61(1992)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

TEL (098)929-0111

FAX (098)929-0115

URL : <http://www.pref.okinawa.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。