

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによるナシ 及びリンゴ果実からのクロロゲン酸の分離とその定量

藤田 修二・川崎 宏隆・東野 哲三
(園芸工学研究室)

昭和60年5月7日 受理

Use of DEAE-Cellulose Column Chromatography for Estimation of Chlorogenic Acid in Pear and Apple Fruits.

Shuji FUJITA, Hirotaka KAWASAKI and Tetsuzo TONO
(Laboratory of Food Science and Horticultural Engineering)

Received May 7, 1985

Summary

Polyphenolic substances were extracted from Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta*) and apple (*Malus pumila* Mill. var. *domestica* Schneid.) fruits with methanol. The extracts were separated into two large peak fractions (F-I and F-II) and a small one by DEAE-cellulose column chromatography. In ultraviolet absorption spectra, F-I and F-II fractions showed an absorption maximum at 280nm and 325nm, respectively. The absorption spectrum and color reactions of F-II were in good agreement with those of chlorogenic acid. Two kinds of chlorogenic acid analogue were detected in F-II by paper chromatography, but not detected in F-I. These results indicated that chlorogenic acid analogues were fractionated into F-II from the fruit extracts by DEAE-cellulose chromatography. The chlorogenic acid content of F-II was obtained by measuring its absorbance at 325nm. The recovery rate of chlorogenic acid added to the pear extract ranged from 96 to 103%. Chlorogenic acid content in pear fruit significantly decreased as the fruit developed.

緒 言

クロロゲン酸 (Chl) はコーヒー酸とキナ酸のエステル化合物であり、その同族体は高等植物に広くかつ量的にも多く分布している。この Chl 同族体は植物の病理及び生理の面に深く関係し^{5,14,22)}、さらに、多くの植物性食品の加工・貯蔵時の酵素的褐変反応の基質としても重要な役割を有することが知られている^{2,6,7,8,9)}。このような Chl が関与する生理化学的変化や褐変反応の機構などを追究するに際しては、精度がよくかつ簡便な Chl 定量法が必要であるが、現在のところ適当な方法は見当たらない。例えば、タバコ葉、トマト葉等比較的 Chl 含量が高い植物組織においては、それらの抽出液についてペーパークロマトグラフィーあるいは薄層クロマトグラフィーを行い、それらクロマトグラムより分離して得られた Chl 画分の325nm 付近 (Chl の極大吸収波長)の吸光度から Chl 含量を求める方法が用いられている^{10,12,13,19)}。また、これらクロマトグラフィーやシリカゲルクロマトグラフィー等によってポリフェノール化合物 (PP) を

分画後、その PP 画分についてガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により Chl を定量する方法も報告されている^{3,4,17,20,23}。しかし、これらの定量操作はかなり繁雑であり、かつ精度もあまり高くないようにみえる。とくに、ナシやリンゴなどの果実では Chl 含量が比較的低く、共存する他の PP 等が多いのでそれらの方法で Chl を分離・定量することはかなり困難であるとされている。最近、青木ら¹⁾は PP の吸着剤の一つである不溶性ポリビニルピロリドンによりリンゴ果肉抽出液中の Chl を分離し、定量している。しかし、その際カラムの展開液として数種の有機溶媒を必要としており、また、その分別操作も極めて繁雑であり、簡便な方法とはいえない。そこで、本実験ではまず Chl 類が一種の弱酸であることに着目し、食品中の Chl 類の分離定量への陰イオン交換クロマトグラフィーの適用を試みた。すなわち、ナシ及びリンゴ果実の抽出液について陰イオン交換体により Chl 類を分画し、その画分の 325nm における吸光度値から Chl を定量する方法について追究した。

材料及び方法

1. 材料

佐賀県伊万里市大川町の農家で栽培されたニホンナシ (幸水, *Pyrus serotina* Rehd. var. *culta*) 果実を 5 月初旬より約 2 週間毎に採取し、使用した。リンゴ (ふじ, *Malus pumila* Mill. var. *domestica* Schneid.) は市場より購入した。

2. 果実抽出液の調製

90 秒間マイクロ波加熱処理 (シャープ[®]電子レンジ R-546 型, 定格高周波出力 520W 使用) した果実 100 g を 600 ml の 70% メタノールと共に磨砕後、果実中に含まれる PP を熱水中にて 3 時間還流抽出した。抽出液を吸引濾過し、濾液を 40~50°C でメタノール臭のなくなるまで (約 30 ml) 減圧濃縮した。濃縮液に水を加えて 100 ml に定容したものを抽出液とした。

3. 陰イオン交換体

陰イオン交換体として DEAE-セルロース (ワットマン[®], DE-23), DEAE-セルロファイン (チッソ[®], AL) 及び DEAE-トヨパール (東洋ソーダ[®], 650M) を使用した。

4. ペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙 No. 51 B (20×20 cm) を用い、2 次元上昇法 (1 次元: 2% 酢酸, 2 次元: ブタノール: 酢酸: 水 4: 1: 2) により展開、風乾後、紫外線下における蛍光物質の有無を調べた。また、ジアゾ化パラニトロアニリン試薬¹⁶⁾及び塩化鉄-フェリシアン化カリウム試薬¹⁶⁾により濾紙上の PP を発色させ、それらスポットの *R_f* 値、呈色反応等を調べた。

5. Chl の定量

DEAE-セルロースにより分画された画分の 325nm における吸光度を測定し、別に作製した検量線を用いて Chl 含量を定量した。

結果及び考察

1. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる Chl の分離

種々の PP は, Fig. 1 に示すように, それぞれの化合物に特有な紫外吸収スペクトルを有する. 本実験ではこれら PP のうち, Chl の極大吸収波長における吸光度 (OD_{325nm}) に影響を及ぼすと考えられる化合物として, 280nm 付近に吸収のピークを有するカテコール及び325nmに近い波長(310nm付近)に吸収のピークを有するコーヒー酸を選び, これらと Chl との 3 成分からなる混合液をモデル系として, 陰イオン交換クロマトグラフィーにおけるそれら 3 成分の分離条件等について検討した. まず, 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-セルロースカラム ($2.2 \times 7.0cm$) にモデル混合液を添加し, 同一緩衝液により溶出した. 溶出液は 5 ml ずつ分取し, カテコールは 280nm, Chl 及びコーヒー酸は 325nm における吸光度を測定した. その際の溶出曲線が Fig. 2(A) であり, カテコール, Chl, コーヒー酸の順でこれらの

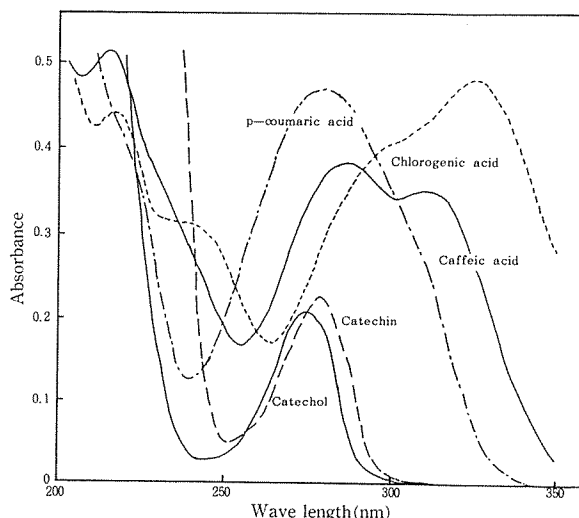


Fig. 1 Absorption spectra of various polyphenolic compounds.

The polyphenolic compounds were dissolved in 0.01M phosphate buffer (pH 7.0).

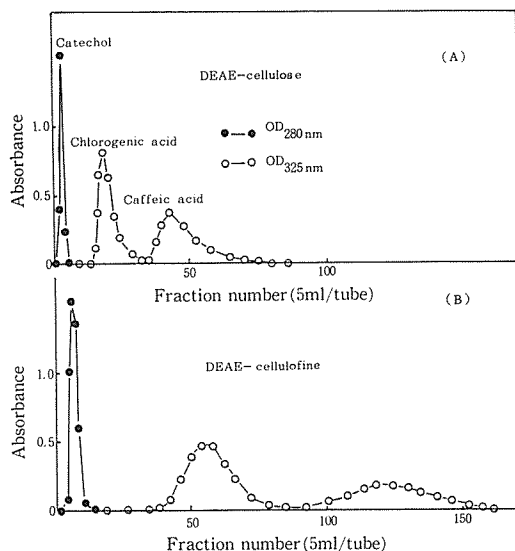


Fig. 2 Elution pattern of the polyphenolic compound mixture on DEAE-cellulose (A) and DEAE-cellulofine (B).

2.5mg of catechol, 2mg of chlorogenic acid and 2mg of caffeic acid were dissolved in 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). The mixture was placed on a column of DEAE-cellulose ($2.2 \times 7.0cm$) or DEAE-cellulofine ($2.2 \times 7.0cm$) equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 7.0), and then eluted with the same buffer.

PP が分離された. この際 Chl の溶出時間は約60分であった. これに対し, DEAE-セルロファイン ($2.2 \times 7.0cm$) により前記と同一条件で分離操作を行ったところ, Fig. 2(B) に示したように, 3 成分の分離は良好であったが, Chl の溶出にかなり長時間 (4 時間以上) を要することが認められた. しかし, DEAE-トヨパール等においては前記条件では Chl 及びコーヒー酸が強く吸着され, これら 3 成分の分離は不可能であった.

以上の結果から, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによってモデル系の 3 成分の分離が能率よく行えることが明らかとなった. そこで, このカラムを用いるモデル系の 3 成分の分離に及ぼす pH の影響について調べた. すなわち, pH 5.0, 6.0 及び 7.0 の 0.01M リン酸緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースカラムにモデル PP 溶液を添加し, それぞれ同一緩衝液により溶出した. その結果, Fig. 3 に示したように, 3 成分の分離には pH 7.0 が好適であり, それより pH が低下するにつれて各々

の化合物の溶出速度は著しく遅延した。なお、pH 8 以上では Chl が緑変するので、アルカリ側での実験は行わなかった。

つぎに、溶出液の濃度の影響について検討した。すなわち、0.01M、0.05M及び0.1Mのリン酸緩衝液 (pH7.0) により平衡化したカラムにモデル PP 溶液を添加し、同一緩衝液でそれぞれ溶出した結果が Fig. 4 である。モデル系の3成分の分離には0.01Mの緩衝液を用いる場合が好適であり、それより緩衝液の濃度が高くなり、そのイオン強度が増加するほど、それぞれの PP の溶出時間は短縮されるものの3成分の分離能は著しく低下することが認められた。

以上のように、0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) により平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.2×7.0cm) を用いることによりモデル混合液において、Chl と他の2つの PP とを容易にかつかなり迅速に分離できることが明らかとなった。そこで、次にこの条件によるナシ及びリンゴ果実抽出液中の Chl の分離を試みた。

2. ナシ及びリンゴ果実抽出液からの Chl 類の分離

ナシ抽出液の紫外吸収スペクトルには Fig. 5 に示したように Chl 類に由来すると思われ

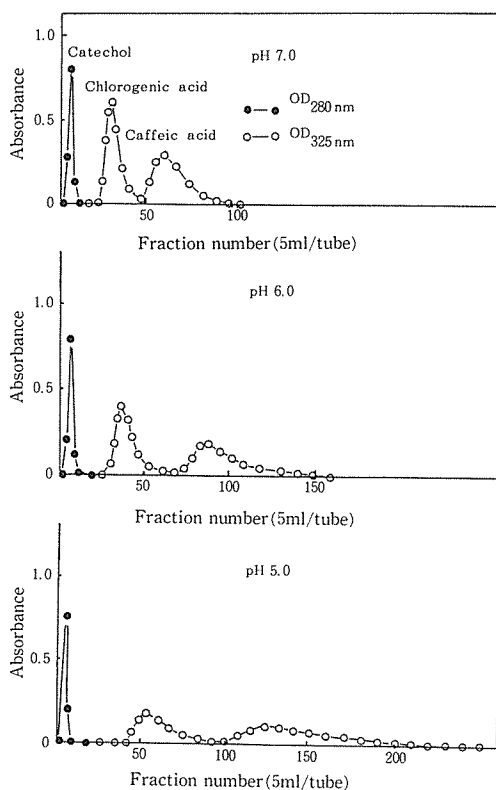


Fig. 3 Effect of pH on the elution pattern of the polyphenolic compound mixture.

The mixture was applied to the column and eluted by the same method as in Fig. 2(A), except that various pH buffer were used.

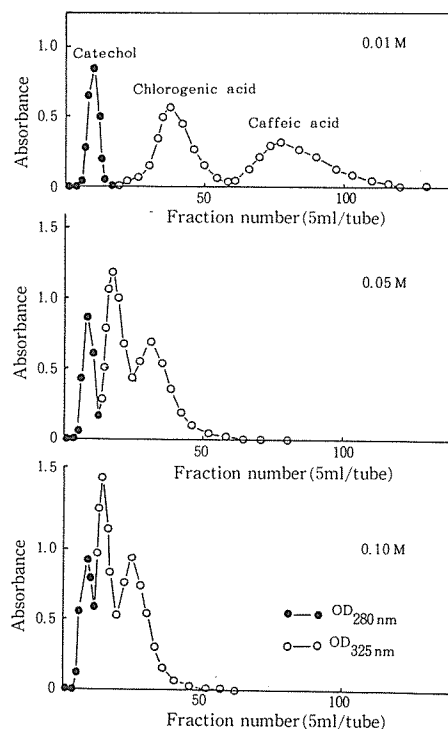


Fig. 4 Effect of buffer concentration on the elution pattern of the polyphenolic compound mixture.

The mixture was applied to the column and eluted by the same method as in Fig. 2(A), except that various concentration buffer were used.

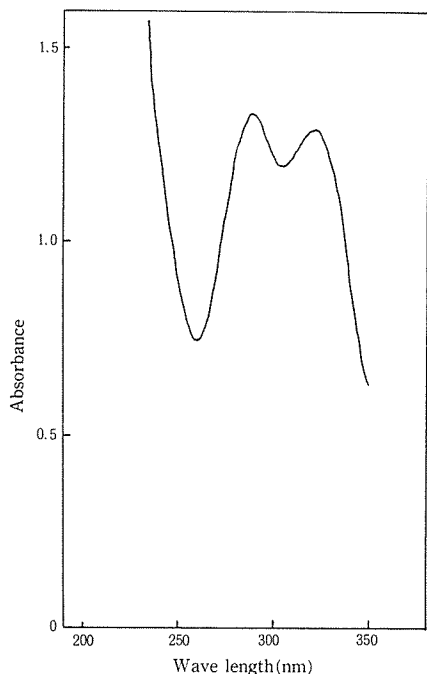


Fig. 5 Ultraviolet absorption spectrum of pear extract.

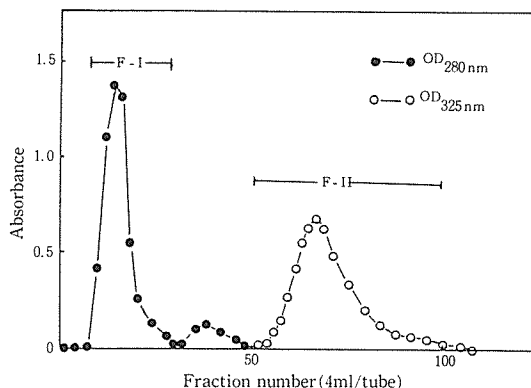


Fig. 6 Elution pattern of pear extract on DEAE-cellulose.

The extract was applied to the column and eluted by the same method as in Fig. 2(A).

る325nm付近のピークとカテキン等ほかのPPに由来すると推定される280nm付近のピークとが認められた。したがって、ナシ抽出液にはこれらPPが混在し、この抽出液のOD_{325nm}より求めたChl含量は他のPPの影響を受け正確な値は得られないと思われる。そこで、他のPPの影響を除くために前記のDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行った。その結果、Fig. 6の溶出曲線に示したように、フラクション番号15付近(F-I)、フラクション番号68付近(F-II)に大きなピークが、フラクション番号30付近に小さなピークがみられた。そこで、大きなピークの画分F-I及びF-IIを集め、それぞれに含まれるPPについて検索した。さきのモデルPP溶液の溶出順序から考えてF-II画分にChl類が溶出しているものと推測される。そこで、このことを確かめるために、まず、F-II画分の紫外部及収スペクトルを測定したところ、Fig. 7のように、それは325nmに吸収のピークを有する等Chlのスペクトルとほぼ一致した。さらに、F-II画分についてペーパークロマトグラフィーを行った結果がTable 1である。F-II画分には紫外線下で極めて強い青白色の蛍光を発するスポットS₂とやや弱い蛍光を発するS₁の2個のスポットが認められ、その蛍光はアンモニア蒸気下ではChlの場合と同様に緑変した。塩化鉄反応等のPPの呈色反応を行った結果、これら2個のスポットのほかには明確なスポットは検出されなかった。このうち、S₂のR_f値はChlのそれとほぼ一致したが、S₁のそれはS₂及びChlのものと相違し、1次元展開方向のR_f値が小さく、2次元展開方向のR_f値は大きかった。このようにS₂はそのR_f値及び呈色反応等がChlのそれらとほぼ一致することから、Chlであろう

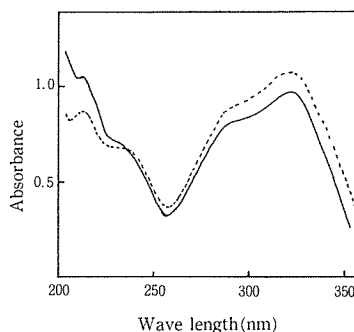


Fig. 7 Ultraviolet absorption spectra of F-II fraction shown in Fig. 6 and chlorogenic acid.
—F-II fraction, chlorogenic acid.

Table 1 Paper chromatography of Fraction II

	R _f value		Color reaction			
	BAW (4 : 1 : 2)	AW (2 : 98)	Fluorescence under UV light +NH ₃		Diazotized p-nitro aniline	FeCl ₃ -K ₃ Fe(CN) ₆
Spot 1	0.77	0.29	Blue	Green	Brown	Blue
Spot 2	0.64	0.56	Blue	Green	Brown	Blue
Chlorogenic acid	0.65	0.56	Blue	Green	Brown	Blue
Caffeic acid	0.84	0.23	Blue	Blue	Brown	Blue
Pyrogallol	0.75	0.68	—	—	Yellow	Blue
Gallic acid	0.62	0.36	—	—	Brown	Blue
Phloroglucinol	0.71	0.58	—	—	Reddish orange	Blue
p-coumaric acid	0.92	0.26	—	—	Orange	Blue

Abbreviations: B; n-butanol, A; acetic acid, W; water, —; colorless.

と推定される。また、S₁はその R_f 値及び蛍光の色調変化等からジカフェイルグループに属する Chl 同族体であろう¹⁶⁾と考えられる。

一方、F-I 及びフラクション番号30付近のピークの画分は280nm 付近に吸収の極大を有するスペクトルを示し、硫酸-バニリン反応に対して陽性であった。したがって、これら画分には Chl 類は存在せず、カテキン類を含むいくつかの PP が混在しているものと推察される。

つぎに、リンゴ果実抽出液についても本カラムクロマトグラフィーによる Chl 類の分離を試

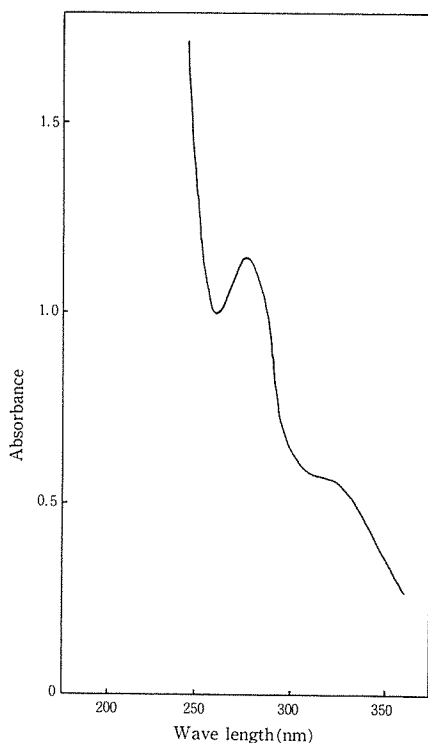


Fig. 8 Ultraviolet absorption spectrum of apple extract.

みた。リンゴ抽出液の紫外外部吸収スペクトルには Fig. 8 に示すように、カテキン等の PP に由来すると思われる280nm 付近のピーク及び Chl 類に由来すると思われる325nm 付近の肩がみられた。この抽出液について前記ナシ抽出液の場合と同一条件で DEAE-セルロースクロマトグラフィーを行った。その結果、Fig. 9 に示したようにリンゴ抽出液の溶出曲線においても Fig. 6 に示すナシ抽出液の場合とほぼ同じ位置に3つのピークが認められた。これらのうち、F-II 画分の紫外外部吸収スペクトル及び呈色反応等は Chl のそれらとほぼ一致した。一方、F-I 及び小さなピークの画分は紫外外部吸収スペクトルにおいて280nm 付近に吸収のピークを示し、硫酸-バニリン反応に対して陽性であった。したがって、リンゴ抽出液の場合にも Chl 類はこの F-II 画分に溶出しているものと考えられる。

以上のように、ナシ及びリンゴ果実抽出液について DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行って得られた F-II 画分には Chl 類が選択的に分離されていることが明らかとなった。前記のように青木ら¹⁾は不溶性ポリビニルピロリドンカラムによる吸着処理によってリンゴ抽出液より Chl を分離

しているが、その画分の吸収スペクトルにおけるピークの位置が325nm よりやや短波長側(320nm)へとシフトしていること、さらに薄層クロマトグラフィーでのスポットにテーリングがみられることなど、Chl 類の分離状態は本実験のDEAE-セルロースクロマト法に比べてやや劣るように思われる。

3. Chl の定量及び回収率

前記のように、ナシ及びリンゴ果実抽出液について DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行うことにより Chl 類を含む画分 F-II を分離し得た。この F-II の 325nm における吸収のピークは Chl 類に由来するものと考えられるので、少なくとも同一品種の青果物試料における一連の実験（例えばそれら果実発育中の Chl 含量の測定等）ではこの F-II 画分の OD_{325nm} を測定し、その値から検量線を用いて Chl 含量を求め、その変化等を追跡することが可能であると考えられる。すなわち、Chl 濃度と OD_{325nm} とは Fig. 10 に示したように比例関係にあるので、これを検量線として F-II 画分の Chl 量を求めることができる。

そこで、一例としてニホンナシ果実の発育過程における Chl 含量の変化を測定した結果が Fig. 11 であり、同図には平均果実重変化の測定結果も記載した。ナシ果実の Chl 含量は発育初期には約150mg%とわけて高い値を示したが、果実の発育に伴って急激に減少し、収穫期(7月下旬以降)には5mg%以下の含量となった。このような果実発育過程における Chl 等の PP 含量の変化はモモ^{11,15)}、ミカン²¹⁾等の果実においても認められている。また、それら果実の幼果期においてみられる顕著な褐変はこの時期に PP 含量が高く、それを酸化する酵素活性も著しく高いこと^{11,15,21)}に起因するのであろうと思われる。

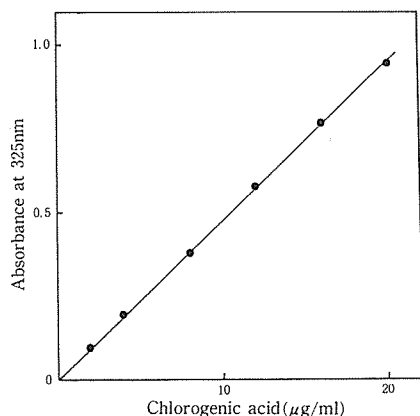


Fig. 10 Standard curve for chlorogenic acid estimation.

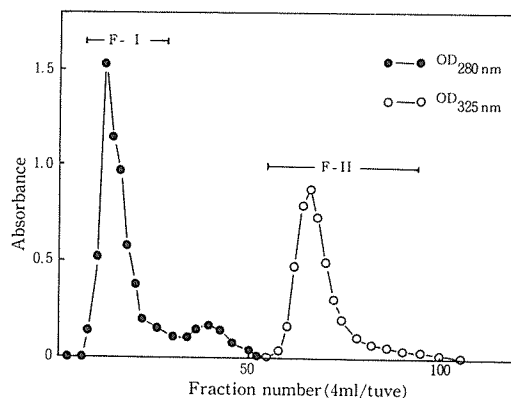


Fig. 9 Elution pattern of apple extract on DEAE-cellulose.

The extract was applied to the column and eluted by the same method as in Fig. 2(A).

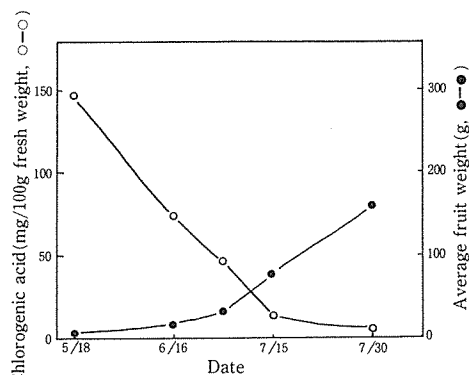


Fig. 11 Changes of chlorogenic acid contents and average weight of pear fruit during the fruit development.

Table 2 Recovery of chlorogenic acid added to the pear extract by the chromatographic method.

Chlorogenic acid added (mg%)	Chlorogenic acid found (mg%)	Chlorogenic acid recovered (mg%)	Recovery (%)
0	14.6	—	—
10	24.9	10.3	103.0
20	34.4	19.8	99.0
40	53.0	38.4	96.0
Average			99.3

The chlorogenic acid standard solution was added to the pear extract and the concentration of chlorogenic acid in the resulting mixture was determined.

つぎに、ナシ抽出液に既知量の Chl を添加し、本カラムクロマトグラフィーによる定量法における Chl の回収試験を行った。その結果、Table 2 に示したように本カラムクロマトグラフ法における Chl の平均回収率は約99%であった。この回収率は青木ら¹⁾による不溶性ポリビニルピロリドンカラム処理によるリンゴの場合の回収率（約93%）と比べてかなり高いと云える。さらに、本カラムは少なくとも5回は連続使用可能であった。

以上のように、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによりナシ及びリンゴ果実抽出液中の Chl が効率よく分離され、その含量をかなり迅速かつ精度よく定量できることを認めた。本法は有機溶媒を必要とせず、また、紫外線モニターの使用により各画分の吸光度測定を自動化することにより操作は比較的簡便となるので、ナシ、リンゴ等の植物性食品中の Chl の簡易分離・定量法として極めて有効であろうと考えられる。

摘 要

園芸食品中のクロロゲン酸 (Chl) 類を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画後、その画分の OD_{325nm} を測定し、Chl 含量を定量する方法について検討した。

1. カテコール, Chl, コーヒー酸からなるモデル混合液について Chl の分離条件を検討した結果、0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.2×7.0cm) を用いることにより、これら3成分が迅速に分離できることを認めた。この条件より緩衝液の pH が低くなるほど、また、その濃度が高くなるほど本カラムによるこれら3成分の分離能は低下した。

2. 上記 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによってナシ及びリンゴ果実抽出液中の Chl 類と他のポリフェノール化合物とがかなり迅速に分画された。この Chl 画分の OD_{325nm} を測定し、別に作製した検量線より Chl 含量を求めた。本カラムクロマトグラフィーを用いる定量法での Chl の回収率は約99%であった。本法によりナシ果実発育過程における Chl 含量の変化を測定したところ、幼果期には Chl 含量が著しく高く、果実の発育に伴ってそれは急激に減少することが認められた。

文 献

- 1) 青木章平・矢萩雄二・田村太郎 (1984). 日食工誌, **31**, 110.
- 2) Chu, N. T., F. M. Clydesdale and J. Francis (1973). *J. Food Sci.*, **38**, 1038.
- 3) Clifford, M. N. (1974). *J. Chromatography*, **94**, 261.
- 4) Dreher, M. L. and E. T. Holm (1983). *J. Food Sci.*, **48**, 264.
- 5) Friend, J. (1979). *Biochemistry of Plant Phenolics*, ed. by T. Swain, J. B. Harborne and V. Sumere, p 557, Plenum Press, New York-London.
- 6) 藤田修二・東野哲三 (1981). 日食工誌, **28**, 600.
- 7) 藤田修二・東野哲三 (1982). 日食工誌, **29**, 214.
- 8) 藤田修二・東野哲三 (1983). 日食工誌, **30**, 650.
- 9) Golon, G., V. Kahn and A. Y. Sadovski (1977). *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1253.
- 10) Hanson, K. R. and M. Zucker (1963). *J. Biol. Chem.*, **238**, 1105.
- 11) Harel, E., A. M. Mayer and H. R. Lerner (1970). *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 542.
- 12) Jangaard, N. O. (1970). *J. Chromatography*, **50**, 146.
- 13) Kojima, M. and I. Uritani (1972). *Plant and Cell Physiol.*, **13**, 311.
- 14) McClure, J. W. (1979). *Biochemistry of Plant Phenolics*, ed. by T. Swain, J. B. Harborne and V. Sumere, p 525, Plenum Press, New York-London.
- 15) 森光国・原田陽一・坪井良至 (1965). 日食工誌, **12**, 88.
- 16) 中林敏郎 (1967). 食品の変色とその化学, p 64~115, 光琳書院, 東京.
- 17) 中林敏郎 (1968). 日食工誌, **15**, 199.
- 18) 中林敏郎 (1984). 日食工誌, **31**, 450.
- 19) Ranadive, A. S. and N. F. Haard (1971). *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 86.
- 20) Sondheimer, E. (1958). *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 131.
- 21) 東野哲三・藤田修二・小宮博喜 (1978). 栄養と食糧, **31**, 95.
- 22) Uritani, I. (1978). *Progress in Phytochemistry Vol. 5* ed. by L. Reinhold, J. B. Harborne and T. Swain, p 29, Pergamon Press, Oxford.
- 23) Walter Jr., W. M., A. E. Purcell and G. K. McCilum (1979). *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 938.