

## 各種食品中エラグ酸分析の試料調製法の検討

天倉吉章<sup>#</sup>, 岡田 舞, 辻 澄子, 外海泰秀

### Studies on Procedure for Sample Preparation of Ellagic Acid in Several Kinds of Foodstuffs

Yoshiaki Amakura<sup>#</sup>, Mai Okada, Sumiko Tsuji and Yasuhide Tonogai

A sample preparation for ellagic acid in several kinds of foodstuffs, which is included in the List of Existing Food Additives as natural antioxidants in Japan, functioning as an antioxidant, was studied. The solid samples were refluxed with methanol, and then the extract was refined using a solid-phase cartridge. The liquid samples were directly pretreated by solid-phase extraction. On the other hand, test solutions for cooking oils and fats were inapplicable to solid-phase extraction in this work, because the recovery tests from samples spiked with ellagic acid gave low recoveries. Consequently, they were prepared by modified frozen method using methanol or acetonitrile-2-propanol-ethanol (2:1:1). The recoveries from tested foodstuffs spiked with ellagic acid (50  $\mu\text{g/g}$ ) were 75.2-96.9%. The limits of quantification for ellagic acid were 0.05  $\mu\text{g/g}$  by the proposed method.

Keywords: ellagic acid, food analysis, frozen method, solid-phase extraction

#### はじめに

エラグ酸は、酸化防止剤として既存添加物名簿に収載され、その基原・製法・本質は、「フトモモ科ユーカリ (*Eucalyptus globulus* LABILL.) などの葉、ヒシ科ヒシ (*Trapa japonica* FLEROV.) の実、ウルシ科ヌルデ (*Rhus javanica* L.) に発生する五倍子、ミロバラン (*Terminalia chubla* RETZ.) の実などを脱脂後、水又はエタノールで抽出して得られたものである。成分はエラグ酸である」と記載されており<sup>1)</sup>、その構造はFig.1に示すような平面構造を有する。エラグ酸はまた、食品の三次機能成分として、抗酸化、抗癌、抗変異原などの諸活性が報告されている<sup>2,4)</sup>。我々は、後者に着目して、生鮮果実及び果実加工品を対象に、固相抽出を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量法を確立し、その含有量調査を実施し報告した<sup>5)</sup>。

現在、エラグ酸については、食品添加物としての使用事例に関する報告はないが、チロシナーゼ阻害物質として美白効果を期待した化粧品への添加が報告されており<sup>6)</sup>、今後、食品添加物としても用途が増加する可能性も考えられる。従って、使用実績のない現在、加工食品中エラグ酸の含有量測定のための検討は、食品添加物としての使用が生

じた際の有用な資料となり、食品衛生上重要である。このような背景に基づき、本報では各種食品中のエラグ酸分析として、その試料溶液の調製法について検討を行ったので報告する。

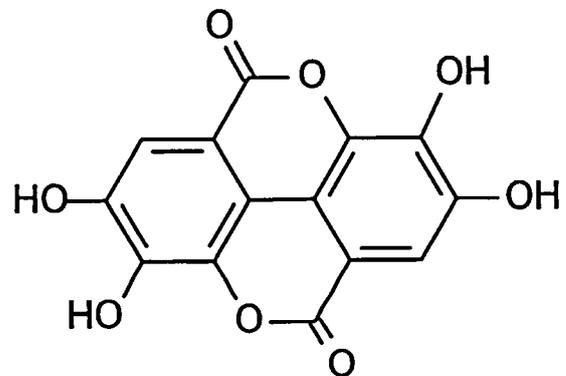


Fig. 1. Structure of ellagic acid

#### 実験方法

##### 1. 試料

試料は、平成11年に大阪市内で購入したパン、ナッツ類 (アーモンド、カシューナッツ、ピーナッツ、ピスタチオ、マカダミアナッツ)、ヨーグルト、飲料 (炭酸飲料、茶飲料、天然果汁飲料、乳飲料)、食用油 (オリーブ油、ゴマ油、サラダ油、ベニバナ油)、バター及びマーガリンを用いた。

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Yoshiaki Amakura; Hoenzaka 1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: amakura@nihs.go.jp

## 2. 試薬及び試液

標準品：エラグ酸二水和物 (min, 99.0 %) [和光純薬工業 (株) 製] は生化学用を用いた。

標準原液：エラグ酸二水和物 56 mg を精ひょうし、エタノールを加え正確に 50 ml とした (エラグ酸として 1 mg/ml)。

標準溶液：標準原液をメタノールで適宜希釈した。

カートリッジカラム：Sep-Pak® Plus tC18 カートリッジ (充填量 900 mg, Waters 社製) をメタノール及び水各 10 ml でプレコンディショニングし使用した。

アセトニトリル、メタノールは HPLC 用を、その他の試薬はすべて試薬特級品を使用した。

## 3. HPLC 装置及び測定条件

### (1) HPLC 装置

LC-10Advp (ポンプ), SPD-M10Avp (フォトダイオードアレイ検出器), SCL-10A (システムコントローラー), CLASS-VP (システム) [以上, (株) 島津製作所製]

### (2) 測定条件

カラム：L-column™ ODS (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm) [(財) 化学物質評価研究機構製], カラム温度：40℃, 流量：1.0 ml/min, 移動相：5 mmol/l リン酸二水素カリウム (pH 2.5) - アセトニトリル (41:9), 波長：360 nm, 注入量：10 μl

## 4. 試料溶液の調製

### 1) 固体及び流動性試料 (パン, ナッツ類, ヨーグルト)

試料 10 g を精ひょうし、メタノール 30 ml を加えて 3 分間ホモジナイズ後、1 時間還流抽出を行った。抽出液を冷後ろ過し、ろ液に 10 ml の水を加え、全量 10 ml になるまで減圧濃縮した。濃縮液に 0.1 mol/l 塩酸 200 μl を加えて、その溶液を Sep-Pak® Plus tC18 カートリッジに負荷し、水 10 ml で洗浄後、メタノール 10 ml で溶出した。溶出液を減圧乾固後、メタノール 5 ml に定容し、メンブランフィルターでろ過後、ろ液を試験溶液とした。

### 2) 液体試料 (飲料)

試料約 10 g を精ひょうし、0.1 mol/l 塩酸 200 μl を加え、その溶液を Sep-Pak® Plus tC18 カートリッジに負荷し、水 10 ml で洗浄後、メタノール 10 ml で溶出した。溶出液を減圧乾固後、メタノール 5 ml に定容し、メンブランフィルターでろ過後、ろ液を試験溶液とした。

### 3) 食用油

試料約 20 g を精ひょうし、分液漏斗に入れ、メタノール 50 ml を加えてシェーカー (KM-Shaker, イワキ製) で 5 分間振とう抽出後、-20~-5℃ の冷凍庫で 2 時間冷凍冷却する。上層を分取し、ろ過後、ろ液を減圧濃縮し、メタノール 10 ml に定容し、メンブランフィルターでろ過後、ろ液を試験溶液とした。

### 4) バター, マーガリン

試料を約 40℃ で加温融解し、その約 5 g を精ひょうし、無水硫酸ナトリウム 10 g 及びアセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液 (2:1:1) 50 ml を加え、3 分間ホモジナイズ後、5 分間超音波処理した。-20~-5℃ の冷凍庫で 2 時間冷凍冷却により脱脂操作を行い、ろ過後、ろ液を減圧濃縮し、メタノール 10 ml に定容し、メンブランフィルターでろ過後、ろ液を試験溶液とした。

## 5. 確認及び定量

エラグ酸の確認は、ピークの保持時間及びフォトダイオードアレイ検出器により、UV 吸収スペクトルを標準溶液のそれと直接比較することにより行った。定量は 360 nm におけるピーク面積を用いて絶対検量線法で行った。

## 結果及び考察

### 1. 抽出, 精製方法の検討

これまで、エラグ酸の前処理法として、有機溶媒による液-液分配法が報告されていた<sup>7,8)</sup> が、前報<sup>5)</sup> において、逆相系カートリッジカラムを用いた簡便、迅速なエラグ酸の精製法を提案し、果実及び果実加工品についてその適用を報告した。本法では同法を改良して、各種食品試料への適用性を検討した。まず固体及び流動性試料 (パン, ナッツ類, ヨーグルト) については、前報<sup>5)</sup> を適用すること、すなわちメタノールで 3 分間ホモジナイズ後、1 時間還流抽出を行い、カートリッジ処理する方法で約 70~97% の良好な回収率が得られたことからそれに従った。液体試料 (飲料) は、試料を直接 Sep-Pak® Plus tC18 カートリッジに負荷し、水で洗浄後、メタノールで溶出する方法で約 80~90% の良好な回収率を得た。次に食用油について、固相抽出の適用を検討した。食用油 20g を分液漏斗に入れ、メタノール 50 ml を加え、5 分間シェーカーにより振とう抽出し、冷凍冷却により脱脂後、上層に水 10 ml を加え、全量を約 10 ml になるまで減圧濃縮した。これを Sep-Pak® Plus tC18 カートリッジに負荷し、水で洗浄後、メタノールで溶出した。その結果、回収率は約 50% で、抽出回数を増やしても、この回収率の向上は認められなかった。そこで各プロセスについて再検討を行った。その結果、カートリッジ処理前の段階で約 90% のエラグ酸が回収されており、従ってカートリッジ処理により回収率を低下させていることが判明した。これは平面構造を有するエラグ酸が油中の脂肪酸間へ取り込まれ、その状態でカートリッジへ吸着し、メタノールでは溶出されなかったことなどが一因として考えられる。これら結果を考慮し、カートリッジ処理を除いた方法、すなわちメタノール 50 ml で振とう抽出後、冷凍冷却により脱脂し、上層を濃縮する方法で約 85% 以上の回収率を得、またこれら操作のみで十分分析可能であることが判明したので、これを適用することにした。次に

Table 1. Recoveries and contents of ellagic acid in foodstuffs

Sample	Added ( $\mu\text{g/g}$ )	Found ( $\mu\text{g/g}$ )	Recovery (%, mean $\pm$ S.D., n=3)
Bread	0	ND	
	50	45.3	90.5 $\pm$ 0.6
Bread (and strawberry jam)	0	9.6	
Nuts			
Almond	0	2.8	
	50	51.3	96.9 $\pm$ 5.0
Cashewnut	0	3.4	
	50	49.7	92.5 $\pm$ 5.5
Macadamia nut	0	1.2	
	50	49.6	96.8 $\pm$ 2.8
Peanut	0	3.2	
	50	41.5	76.6 $\pm$ 5.3
Pistachio	0	2.1	
	50	47.7	91.2 $\pm$ 5.6
Yogurt	0	ND	
	50	39.9	79.7 $\pm$ 2.2
Yogurt (with strawberry)	0	5.0	
Drinks			
Apple juice	0	0.6	
	50	44.5	87.7 $\pm$ 0.4
Dairy drink	0	ND	
	50	40.4	80.7 $\pm$ 2.1
Grape juice	0	2.5	
	50	45.5	86.0 $\pm$ 1.8
Green tea	0	ND	
	50	44.6	89.2 $\pm$ 2.0
Pomegranate juice	0	14.3	
	50	59.6	90.5 $\pm$ 0.4
Prune juice	0	ND	
	50	43.4	86.7 $\pm$ 0.8
Soda drink	0	ND	
	50	44.4	88.7 $\pm$ 2.3
Soft drink	0	ND	
	50	45.7	91.3 $\pm$ 1.1
Cooking oils			
Salad oil	0	ND	
	50	44.0	88.0 $\pm$ 2.1
Safflower oil	0	ND	
	50	42.8	85.6 $\pm$ 2.8
Olive oil	0	ND	
	50	45.1	90.2 $\pm$ 3.8
Sesame oil	0	ND	
	50	47.2	94.3 $\pm$ 3.4
Butter	0	ND	
	50	38.2	76.3 $\pm$ 4.2
Margarine	0	ND	
	50	37.6	75.2 $\pm$ 5.2

ND: Not detected (&lt;0.05 ng/g)

Table 1. Recoveries and contents of ellagic acid in foodstuffs

バター、マーガリンについて、食用油に準じて検討した。まず抽出溶媒については、食用油では抽出溶媒がメタノールで可能であったが、バターの場合では油分のメタノールへの移行が多く、後処理が困難であった。そこで「フェノール系酸化防止剤、指定外酸化防止剤」の試料調製法<sup>9, 10)</sup>を参考に、アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液 (2:1:1) での抽出、冷凍冷却による脱脂法を適用したところ、後処理も簡易で、さらに76%の回収率を得ることが出来た。またカートリッジの適用は、食用油と同様に回収率の低下が認められたこと、及びカートリッジ処理がなくても分析可能であったことから、アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液 (2:1:1) 抽出後、冷凍冷却による脱脂法で行った。

## 2. 添加回収試験

エラグ酸の標準原液 (1 mg/ml) をパン、ナッツ類、ヨーグルト、飲料に500  $\mu\text{l}$ 、食用油に1 ml、バターに250  $\mu\text{l}$ 、それぞれ添加し (各50  $\mu\text{g/g}$  試料)、本法に従い、添加回収試験を実施したところ、76.3~96.9%の回収率が得られた。結果をTable 1に示す。また本法における定量限界は、0.05  $\mu\text{g/g}$  であった。

## 3. 各種食品中のエラグ酸分析

本法を用いて、各種食品中のエラグ酸含有量分析を行った。その結果をTable 1に示す。なお、今回の検討では食品中のエラグ酸は、イチゴジャムパン、イチゴ入りヨーグルトなどからの検出からわかるように、天然物 (果実中、特にベリー類、ナッツ類) 由来の含有成分として検出された。

## 文 献

- 厚生省告示第120号 (1996)。“既存添加物名簿”平成8年4月16日。
- Bhargava, U. C. and Westfall, B. A.: *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1674-1677 (1968).
- Mandal, S. and Stoner, G. D.: *Carcinogenesis*, **11**, 55-61 (1990).
- Wood, A. W., Huang, M. T., Chang, R. L., Newmark, H. L., Lehr, R. E., Yagi, H., Sayer, J. M., Jerina, D. M. and Cornney, A. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5513-5517 (1982).
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 206-211 (2000) .
- Masuda, M.: *Kagaku to Kogyo (Chemistry and Chemical Industry)*, **51**, 1066-1069 (1998).
- Shahzad, S. and Bitsch, I.: *J. Chromatogr. A.*, **741**, 223-231 (1996).
- Daniel, E. M., Krupnick, A. S., Heur, Y. -H., Blinzler, J. A., Nims, R. W. and Stroner, G. D.: *J. Food Compos. Anal.*, **2**, 338-349 (1989).
- Mikamo, E., Okada, Y., Semma, M. and Ito, Y.: *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem)*, **6**, 38-42 (1999).
- 谷村顕雄, 藤井正美, 義平邦利, 伊藤誉志男, 城 照雄監修 “食品中の食品添加物分析法解説書” 東京, 講談社, 1992, p. 888-890.