

クロマトグラフィー分析による原料ウコンの化学的分類

—エタノールエキスの分析による分類—

照屋正映、玉村隆子

県内で活用されている健康食品素材のうち、主要アイテムとなっているウコンをモデルとして、クロマトグラフィー分析による原料ウコンの化学的な分類を行った。ウコンのエタノールエキスについて、ガスクロマトグラフィー分析（GC分析）、高速液体クロマトグラフィー分析（HPLC分析）それぞれにおいてクロマトグラム上の主要ピークのパターンから4つのグループに分類できた。また、グループ毎の1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）ラジカル消去能、クルクミン類濃度の平均値において、グループ間に有意に差が見られるものがあった。

1 はじめに

ウコン (*Curcuma longa* Lin. (*Curcuma domestica* Val.)) は、県内における健康食品素材として大きなシェアを占めており、その商品形態も乾燥スライス、粉末、錠剤、エキス、お茶など様々な加工形態がある¹⁾。また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、インドネシア、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、系統や産地によりクルクミン類の含有量や精油量などの成分特性に差があるとされている。この成分特性の差は、ウコンを原料とした加工製品の品質のパラツキとして現れてくることが予想され、一定品質の製品を安定的に生産するためには、原料として利用されるウコン類の成分特性についての評価基準を用意し、原料の評価を行うことが必要である。

ウコンの成分としては、クルクミンがよく知られており、その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²⁾。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しない場合があることが考えられ、成分を総合的にとらえた評価法が必要である。こうした評価法としては、児嶋らによるウコン属植物の精油成分によるガスクロマトグラムパターンによる分類や、ベトナム産ウコンについてのガスクロマトグラムパターンとHPLCクロマトグラムパターンによる分類例の報告^{3,4)}があるが、統計的解析による分類はなされていない。

本研究では、ウコン原料を評価するための基準作りを目的として、主に県内で扱われているウコンのエタノールエキス、精油、熱水エキスのGC分析、HPLC分析を行って、クロマトグラフィー分析による化学的な分類を行い、その結果を統計的に解析し、またグループ毎のDPPHラジカル消去能について比較検討を行ってきた。本報で

は、各サンプル間においてDPPHラジカル消去能に大きな差が見られたエタノールエキスの結果について報告する。

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。

GC分析には、島津製作所GC-17A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 試料及び試薬

本研究において用いたウコン試料を表1に示す。

抽出溶媒にはエタノール（関東化学、特級）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（上水を蒸留、脱イオン後0.20μmメンブレンフィルター濾過）を使用した。

また、クルクミン類標準試薬クルクミン1（Curcumin）、クルクミン2（Demethoxycurcumin）、クルクミン3（Bis-demethoxycurcumin）はそれぞれナカライテスク株式会社製を用いた。

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た。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。また、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。

表1 本研究で用いたウコン試料

サンプルNo.	入手先	産地/系統
1	海外企業	マダガスカル産
2	海外企業	インド産
3	海外企業	中国産
4	沖縄県内企業	不明
5	沖縄県内企業	県内産(県内系統)
6	沖縄県内企業	海外産
7	沖縄県内企業	県内(県内系統)
8	沖縄県内企業	不明
9	琉球大学	県内(県内系統)
10	沖縄県内企業	県内(県内系統)
11	沖縄県内企業	県内(県内系統)
12	沖縄県内企業	県内(県内系統)
13	沖縄県内市場	県内(県内系統)
14	県農業試験場園芸支場	県内(県内系統)
15	県農業試験場園芸支場	県内(ベトナム系統)
16	県農業試験場園芸支場	県内(県内系統)
17	県農業試験場園芸支場	県内(ベトナム系統)
18	沖縄県内企業	不明
19	沖縄県内企業	県内(県内系統)
20	沖縄県内企業	県内(県内系統)
21	沖縄県内企業	県内(県内系統)
22	沖縄県内企業	県内(県内系統)

2-4 エキスの調製

エタノールエキスの調製は、試料乾燥粉末の重量に対して10倍容量のエタノールを加え、室温で30分間、超音波浴槽で抽出を行った。抽出後、室温で20分間、1,600rpmで遠心分離を行い、上清を0.45 μmフィルターで濾過してエタノールエキスとした。

表2 GC分析条件

検出器	FID
カラム	DB-1 (30 x 0.32mm ID, 0.25 μm J&W SCIENTIFIC)
キャリアーガス	He
カラム流量	1mL/min
線速度	29cm/s
全流量	105mL/min
スプリット比	1:100
検出器温度	320℃
カラムオープン温度	0min 150℃→2min 150℃→300℃(10℃/min)

2-5 GCによる分析

GC分析の条件は、上原らの条件を参考にした⁹⁾。(表2)

2-6 HPLCによる分析

HPLC分析の条件は、溶媒について条件を検討した結果、表3、4に示すとおりとし、エキスを10倍希釈したものについて分析を行った。

表3 HPLC分析条件

カラム	Waters Symmetry C18
流速	1mL/min
カラム温度	35℃
検出器	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4 HPLC分析溶媒条件

	水	アセトリル
初期値	80%	20%
25分	0%	100%
28分	0%	100%

2-7 クルクミン類濃度測定

エタノールエキス中のクルクミン類濃度の測定は、表5、6に示す条件でHPLC分析により行った。

表5 HPLC分析条件

カラム	Waters Symmetry C18
流速	1mL/min
カラム温度	35℃
検出器	フォトダイオードアレイ検出器 検出波長 425nm

表6 HPLC分析溶媒条件

	1%ギ酸	水	アセトリル
初期値	10%	70%	20%
25分	0%	0%	100%
28分	0%	0%	100%

2-8 統計解析

統計処理は、EXCEL(マイクロソフト社)およびEXCEL統計(エスミ社)、EXCEL多変量解析(エスミ社)を用いた。

表7 各サンプルGCクロマトグラムにおけるピーク高さ

サンプルNo.	ピーク1	ピーク2	ピーク3	ピーク4	ピーク5	ピーク6	ピーク7
1	6053	4062	1550	9642	41134	20934	23219
2	2163	2269	563	3323	25495	24615	20118
3	4729	2305	936	5023	52472	25899	32061
4	1297	616	264	1543	30985	10812	15968
5	3548	7654	1464	7931	353	10000	7085
6	1442	639	256	1618	20510	6967	10147
7	5583	25792	3738	19139	5020	12637	6820
8	5400	15826	2638	13391	6207	10836	6794
9	7210	44754	5796	29331	7372	25003	11840
10	3686	28252	3450	18050	3932	16676	7173
11	5007	32512	4038	22025	6788	20274	8948
12	4796	33119	4091	22266	5696	19691	9077
13	11121	70781	9221	46918	994	34944	16457
14	7745	5270	2048	9781	9690	3917	6074
15	1430	3231	626	4769	19896	33165	19055
16	4673	27905	3913	18620	3068	9063	5396
17	2089	7991	1202	9991	16641	56399	25404
18	2374	13490	1804	11749	11139	34863	13555
19	1169	22754	2479	14157	2225	14559	6168
20	1101	19988	2183	12017	1832	12382	5158
21	873	19672	2053	10625	1632	11560	4561
22	859	17510	1823	9372	1417	8889	3636

3 実験結果及び考察

3-1 GC分析によるグループ化

各サンプルGCクロマトグラムの主要ピークの高さを表7に示す。

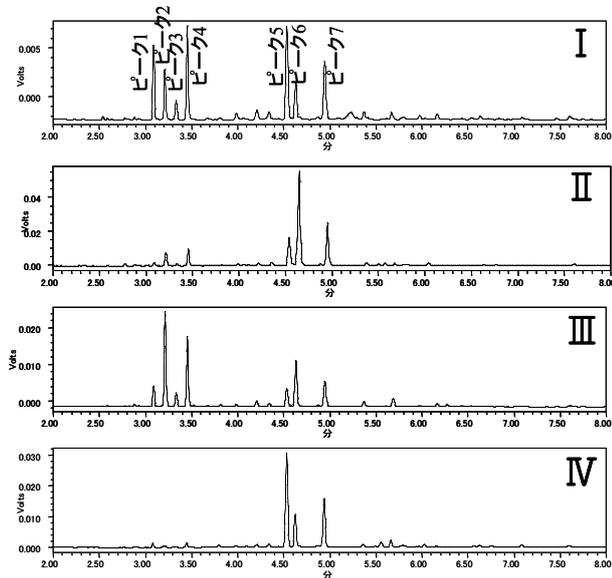


図1 GCクロマトグラムの分類

表8 GCクロマトグラムの分類と特徴

グループ	サンプルNo.	特徴
I	14	ピーク1,4,5が大きく、ついで2,7が大きい。
II	15,17,18	ピーク6が大きく、ついで7,5が大きい。ピーク2,4は非常に小さい。
III	5,7,8,9,10,11, 12,13,16,19, 20,21,22	ピーク2が大きく、ついで4,6が大きい
IV	1,2,3,4,6	ピーク5が大きく、ついで7,6が大きい。ピーク1,2,3,4はともに非常に小さい。

各サンプルについて、GCクロマトグラムにおける主要ピークの特徴より、図1に示すように大きく4つのグループに分類し、各グループのクロマトグラムの特徴を表8に示す。なお、GC-MS分析のMSスペクトルとデータベースのMSスペクトルとの照合により、ピーク2はZingiberenと同一とされ、これは文献と一致していた。他のピークについては、文献の保持時間とクロマトパターンから α -Curcumene (ピーク1)、 β -Bisabolene (ピーク3)、 β -Sesquiphellandrene (ピーク4)、ar-(+)-Turmerone (ピ

ーク5)、 α -Turmerone (ピーク6)、 β -Turmerone (ピーク7)と推定した。

次に、サンプル毎にそのクロマトグラムにおける各ピーク高さを合計し、合計に対する各ピーク高さの割合を求め、この割合を変数として主成分分析を行った。各主成分の固有ベクトルを表9に、主成分分析サンプルプロットを図2に示す。なお、主成分1および2の寄与率はそれぞれ81.10%、14.89%、累積寄与率は95.99%で、情報の90%以上を主成分1、2で説明できている。主成分分析サンプルプロットにおいても4つのグループに分かれていることが確認できる。主成分1は表8の固有ベクトルより、ピーク2,4のセスキテルペノイドが正の相関を示しピーク5,7の含酸素セスキテルペノイドが負の相関を示している。このことから、主成分1は4つのセスキテルペノイドの含有量が高くなるに伴いスコアは高く、含酸素セスキテルペノイド含有量が高くなるに伴いスコアは低くなり、両者のバランスを表す軸と解釈される。

表9 各主成分の固有ベクトル

	主成分 1	主成分 2
ピーク 1	0.0196	-0.1616
ピーク 2	0.6132	-0.1734
ピーク 3	0.0661	-0.0481
ピーク 4	0.3279	-0.1559
ピーク 5	-0.6510	-0.4232
ピーク 6	-0.0949	0.8521
ピーク 7	-0.2809	0.1100

主成分 1

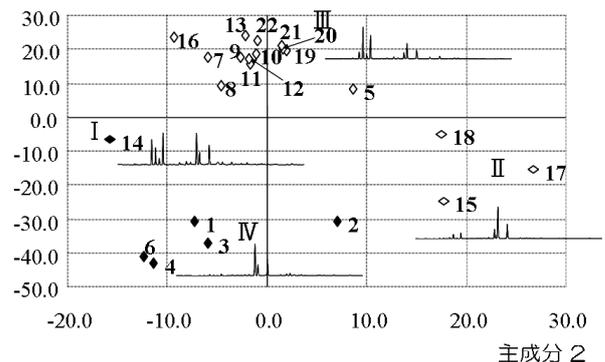


図2 GCクロマトグラムの主成分分析プロット

表10 各サンプルHPLCクロマトグラムにおけるピーク高さ

サンプルNo.	ピーク8	ピーク9	ピーク10	ピーク11	ピーク12	ピーク13※	ピーク14	ピーク15	ピーク16
1	1195880	654685	977976	742254	4244	831377	410362	58313	206389
2	1116260	1239676	4553992	465320	2070	773878	509702	23030	72150
3	1338513	1350431	4229720	866215	4073	1037338	469474	42994	93354
4	431242	485777	1349165	351610	1591	371840	138614	9736	17430
5	26161	95319	384821	89694	38576	144986	160772	23662	154386
6	329040	391189	1112426	310266	1023	324972	127378	14539	28006
7	81767	329098	785458	110985	66588	254484	346155	51387	695947
8	21239	91958	350339	112666	58355	186430	237122	48848	357252
9	15122	77319	283110	81269	70498	201536	322518	37425	507500
10	29237	103204	357001	67502	57926	205913	339659	22940	453174
11	64562	225133	765338	133396	57714	316720	458452	37022	636071
12	22247	117190	389449	90925	62919	231727	357853	30421	502641
13	42609	167163	549826	88060	76262	256377	413120	34304	747492
14	18852	94559	384707	149473	23602	142961	76174	67570	207315
15	1746734	1137842	2591362	286135	2425	603696	591690	10469	86306
16	26874	228956	376474	54794	66837	139734	216615	29513	554891
17	2590265	1560528	3781498	321028	2343	1135917	1340080	21809	256839
18	1252410	853484	1737888	215062	4143	585178	775797	27021	331684
19	10030	56267	181570	40048	43516	167984	308401	17389	387148
20	14419	61062	195819	43171	50087	179181	341059	18342	399969
21	23161	73397	212333	37119	40708	156463	300464	15586	392641
22	16496	43562	148221	39532	36364	134615	257240	15088	342265

※ピーク13については、229nmにおけるピーク高さ

3-2 HPLC分析によるグループ化

各サンプルHPLCクロマトグラムの主要ピークの高さを表10に示す。

各サンプルについて、HPLCクロマトグラムにおける主要ピークの特徴より、図1に示すように大きく4つのグループに分類し、各グループのクロマトグラムの特徴を表11に示す。なお、ピーク8,9,10は標品の保持時間およびスペクトルとの比較よりそれぞれ、Bis-demethoxycurcumin (ピーク8)、Demethoxycurcumin (ピーク9)、Curcumin (ピーク10)であった。

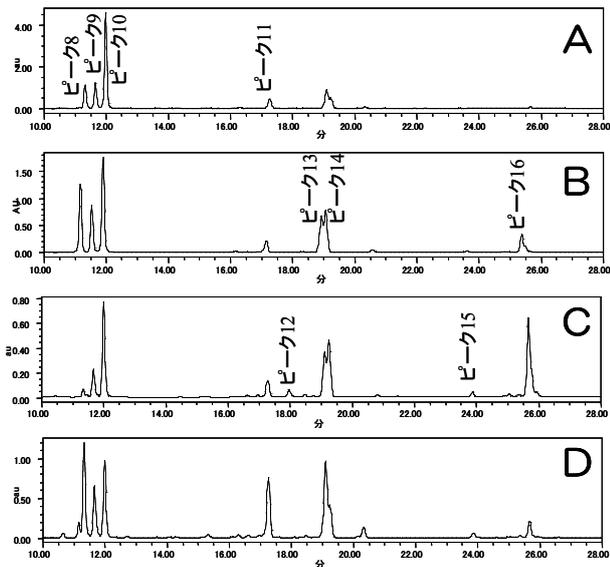


図3 HPLCクロマトグラムの分類

表11 HPLCクロマトグラムの分類と特徴

グループ	サンプルNo.	特徴
A	2,3,4,6	ピーク10が大きく、ついで8,9が同じくらい (10>8,9)。ピーク12,16については非常に小さい。
B	15,17,18	ピーク10が大きく、ついで8,9と続く (10>8>9)。ピーク16はあるが小さい。
C	5,7,8,9,10,11,	ピーク10が大きく、ついで9,8と12,13,14,16, 続く (10>9>8)。ピーク13,14,16 19,20,21,22 も大きい。
D	1	ピーク8が大きく、ついで10,9と続く (8>10>9)。ピーク11,13も大きい。

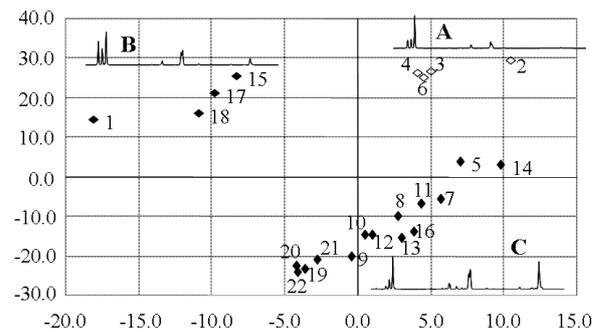
次に、GC分析の時と同様、サンプル毎にそのクロマトグラムにおける各ピーク高さを合計し、合計に対する各ピーク高さを割合を求め、この割合を変数として主成分分析を行った。各主成分の固有ベクトルを表10に、主

成分分析サンプルプロットを図6に示す。なお、主成分1,2の寄与率はそれぞれ80.43%、9.35%、累積寄与率は89.78%で、情報の約90%を主成分1,2で説明できている。これに表7におけるグループを当てはめてみると、グループCがかなり広い範囲にわたっているが他のグループとは離れており、また主成分1のスコアが小さいことから、主成分1と正の相関を示すクルクミン類のピーク8,9,10が小さく、負の相関を示すピーク14,16などが大きいグループであることは表9における特徴と一致している。サンプルNo.1は、先の図5、表9においてグループDと分類したが、主成分分析サンプルプロットにおいては、グループBに分類できると考えられ、HPLC分析においては3つのグループに分類できると考えられる。

表12 各主成分の固有ベクトル

	主成分 1	主成分 2
ピーク 8	0.3430	-0.7261
ピーク 9	0.1746	-0.0807
ピーク 10	0.4328	0.5380
ピーク 11	0.0829	0.1042
ピーク 12	-0.0839	0.0489
ピーク 13	0.1492	0.1827
ピーク 14	-0.3740	-0.3108
ピーク 15	-0.0262	0.0782
ピーク 16	-0.6984	0.1656

主成分 1



主成分 2

図4 HPLCクロマトグラムの主成分分析プロット

4 まとめ

エタノールエキスのクロマトグラムピークパターンによるグループ化をまとめたものを表13に示す。

ウコンの活性成分としては、クルクミン類がよく知られている。そこで、各サンプルのエタノールエキス中のクルクミン類濃度を定量し、グループ毎に平均値で示したものを図7に示す。なお、クルクミン1、クルクミン2、

表13 グループ化のまとめ

サンプルNo.	GC	HPLC	グループ化まとめ
1	IV	B	IVB
2	IV	A	IVA
3	IV	A	IVA
4	IV	A	IVA
5	III	C	III C
6	IV	A	IVA
7	III	C	III C
8	III	C	III C
9	III	C	III C
10	III	C	III C
11	III	C	III C
12	III	C	III C
13	III	C	III C
14	I	C	I C
15	II	B	II B
16	III	C	III C
17	II	B	II B
18	II	B	II B
19	III	C	III C
20	III	C	III C
21	III	C	III C
22	III	C	III C

クルクミン3をそれぞれサンプル毎に定量し、合計したものをクルクミン類濃度とした。また、グループを形成しなかったサンプルNo.1およびNo.14のクルクミン類濃度はそれぞれ1996 μ g/mL、430 μ g/mLであった。

III Cのグループは、II B、IVAのグループに比べてクルクミン類濃度は1/7~1/6と低く、他のグループと有意に差が見られたが、II B、IVAのグループ間に差は見られなかった。

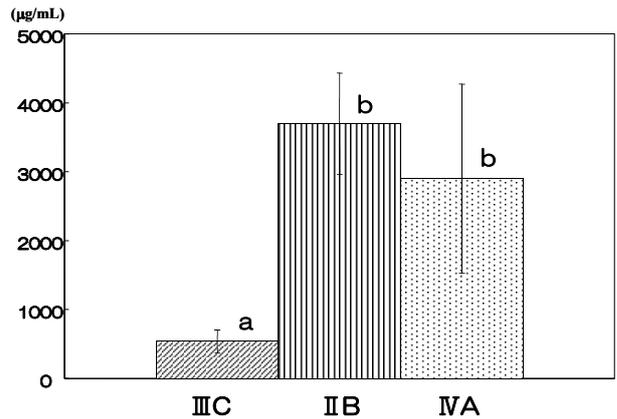


図5 グループ毎のクルクミン類濃度平均値

また、ウコンは抗酸化活性があることが知られている⁶⁾。そこで次に抗酸化活性の指標として、各サンプルのエタノールエキスについてDPPHラジカル消去能を測定したグループ毎の平均値を図8に示す。DPPHラジカル消去能は、DPPHラジカル50%を消去する各サンプルの希釈倍率で表した。すなわち、希釈倍率が大きいほどラジカル消去能が強いということになる。また、各カラム右肩のアルファベットが異なるもの同士は有意差が合ったことを示す。III Cのグループは活性が弱く、先述のクルクミン類濃度と同様にII B、IVAのグループそれぞれとの間に有意に差が見られたが、II B、IVAのグループ間に差は見られなかった。

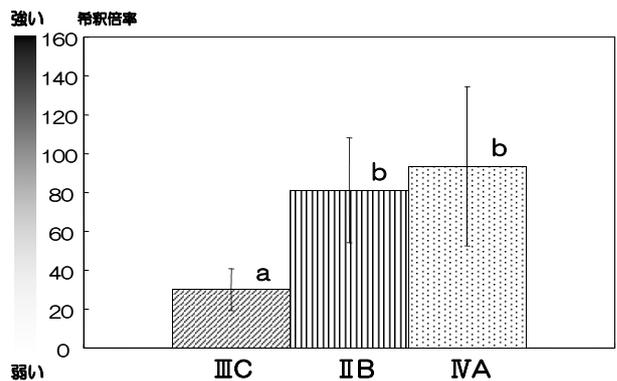


図6 グループ毎のDPPHラジカル消去能平均値

表13のグループを表1における各サンプルの産地または系統と対比させると、IVAとされたグループには、主に海外産のサンプルが分類されていることが分かる。また、一番分類されたサンプル数の多かったIII Cのグループには主に県内産のサンプルが、II Bのグループには海外系統のウコンを県内で栽培したサンプルがそれぞれ分類されている。

本研究において確立したウコンをクロマトグラムパタ

ーンで化学的な分類をするための分析方法および評価する基準（グループ、クルクミン濃度、DPPHラジカル消去能）を活用することにより、ウコンを利用した健康食品製造における原料の品質管理が期待できる。

謝辞

本研究は、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き、またDPPHラジカル消去能の測定を行って頂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。

また、ウコンサンプルをご提供頂いた方々に感謝致します。

参考文献

- 1) 沖縄県健康食品産業実態調査事業報告書 (2003)
- 2) 中薬大事典 (2007) 小学館
- 3) 児嶋脩、八沢麻貴子、豊田祥広、梁井哲也、齋木保久、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)
- 4) 児嶋脩、冷水恵巳子、小島壮、山本泰子、富永英夫、佐藤繁嘉、Nguyen Xuan Dung、齋木保久 日本生薬学会第51回年会講演要旨集、72(2004)
- 5) 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)
- 6) ハーブ&サプリメント (2007) 産調出版

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

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.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。