Folin-Denis 法による総ポリフェノール量 測定のための抽出溶媒の検討

鈴木 誠, 渡辺敏郎, 三浦麻子*, 原島恵美子*,
中川靖枝*, 辻 啓介

An Extraction Solvent Optimum for Analyzing Polyphenol Contents by Folin-Denis Assay

Makoto Suzuki, Toshiro Watanabe, Asako Miura*,
Emiko Harashima*, Yasue Nakagawa* and Keisuke
Tsuji

*School of Humanities for Environmental Policy and
Technology, Himeji Institute of Technology, Shinzaikai-
Honcho, Himeji, Hyogo 670-0092*

**Faculty of Human Life Sciences Jissen Women's
University, Ohsakaue, Hino, Tokyo 191-8510*

An optimum solvent is described for analyzing total polyphenol contents by the procedure of Folin-Denis assay. We used water, ethanol, methanol, acetone or dimethyl sulfoxide (DMSO) as the extraction solvent for the polyphenol analysis of several food materials. All these solvents provided excellent calibration curves for (+)-catechin in the range of 62.5 to 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r^2 = 0.998\text{--}0.999$). DMSO gave the highest value of total polyphenol contents compared to the other solvents. Therefore, DMSO was proved to be the best solvent for the extraction of polyphenols from food samples. This improved method can be applied to the analysis of polyphenol contents in other food samples.

(Received Jan. 9, 2002 ; Accepted Apr. 4, 2002)

食品中には様々な成分が含まれているが、なかでもポリフェノールは活性酸素消去能を有することで注目されている。食品中のポリフェノール量を測定するには、フォトダイオードアレー検出器をとりつけた高速液体クロマトグラフ^{1)~12)}や、キャピラリー電気泳動¹³⁾¹⁴⁾により成分分析をおこなう方法や、バイオセンサー¹⁵⁾を用いて分析する精密な方法がある。しかし、これらの手法を用いた場合、ある特定のポリフェノール成分の測定は可能

であるが、未知の成分を含む総量を定量することは難しい。一方、Folinらは比色法により赤ワイン中の総ポリフェノール量の測定をおこなった¹⁶⁾。このFolin-Denis法は、フェノール試薬を用いた反応で、特殊な技術や機器が必要なく、ルーチンで総ポリフェノール量を測定することができる簡易迅速な方法¹⁷⁾¹⁸⁾であることから、今なお総ポリフェノール量を測定するのに多用されている¹⁹⁾²⁰⁾。抽出条件の違いで抽出効率が異なるという欠点があるため、測定者によって得られる値は一定ではなかった。そこで今回、Folin-Denis法による試料の抽出条件を種々検討した結果、抽出溶媒の種類によって抽出効率が異なることが認められたので報告する。

1. 試料および実験方法

(1) 実験試料および装置

実験試料は表1に示したように、ポリフェノールを含む食品の抽出物を使用した。比色法に用いたフェノール試薬はMERCK製の特級(Folin-Ciocalteu)を、抽出溶媒に用いた試薬は全てナカライテスク製の特級を使用した。また、測定にはBECKMAN製の分光光度計(DU-640)を使用した。

(2) 検量線

ポリフェノールの含有量はカテキン量に換算して表した。すなわち、D-(+)-カテキン(SIGMA製)4mgを抽出溶媒4mlに溶解し、その液を用いて系列的に希釈して検量線を得た(62.5~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

(3) ポリフェノールの抽出

抽出溶媒には蒸留水、各種濃度の含水エタノール、含水メタノール、含水アセトンおよびジメチルスルホキシド(DMSO)を使用した。表1に示した各種食品素材のポリフェノールをこれらの溶媒で抽出し、溶媒の違いでポリフェノール量の変化を比較した。各試料25mgを精秤し、室温で15分間抽出した後、50mlに定容した。次に濾過(濾紙ADVANTEC No.7)を行い、その濾液から50 μl ずつ試験管にサンプリングした。水4ml、フェノール試薬(Folin-Ciocalteu)を水で5倍に希釈したもの1ml、10% (W/V)炭酸ナトリウム溶液1mlを加え暗所で1時間反応させ、その後ただちに比色定量(OD=760nm)した。

(4) 添加回収実験

(+)-カテキンとデキストリンを混合し、(+)-カテキン量を本法にて測定することで、実際に添加した(+)-カテキン量との比から回収率を算出した。(+)-カテキン

姫路工業大学環境人間学部(〒670-0092 兵庫県姫路市新在家本町1-1-12)

* 実践女子大学生活科学部(〒191-8510 東京都日野市大坂上4-1-1)

表 1 実験に用いた食品抽出物試料

	商品名	メーカー
赤ワイン抽出物	レッドワインポリフェノールパウダー	ライオン
緑茶抽出物	サンフェノン 100S	太陽化学
イチョウ葉抽出物	イチョウ葉エキス抽出物	ヤエガキ醸酵技研

ンとデキストリンを 1:1 で混合させた場合と, 1:3 で混合させた場合の添加した (+)-カテキン含有量を測定した.

2. 実験結果

(1) (+)-カテキンによる検量線

得られた検量線は, 使用したどの溶媒においても極めて良好な直線性を示した ($r^2=0.998\sim0.999$). この検量線をもとに, 各試料における総ポリフェノール量を測定した.

(2) ポリフェノールの抽出効率

各種食品素材についてポリフェノールを 3 種の含水有機溶媒で抽出し, その含有量を比較検討した. 図 1 に示したように, 赤ワイン抽出物では, 抽出溶媒に蒸留水単独を用いた場合よりも, 含水エタノールを用いたほうが総ポリフェノール量の数値は高くなった. エタノール濃度によっても違いがみられ, 20~40% エタノールで最も高い値を示し, それ以上の濃度になると逆に値は低くなった. 抽出溶媒に DMSO を用いると, 含水エタノール溶液よりも更に高い値を示した. また含水メタノール, 含水アセトンで抽出した場合では, 蒸留水の場合よりも低い値を示した.

緑茶抽出物中の総ポリフェノール量は, 蒸留水を用いた場合よりも, 含水アセトン<含水エタノール<含水メタノールの順に高くなり, DMSO で最も高い値を示した. 各溶媒の濃度による違いでは, 40% 前後で高い値となり, それ以上の濃度では低くなった.

イチョウ葉抽出物中の総ポリフェノール量は, 40% アセトン, 75% エタノール, 60% メタノールでそれぞれ極大値を示し, これも他の試料の場合と同様に DMSO で最も高い値を示した. また, 緑茶抽出物と同様に蒸留水で最も低い値を示した.

(3) 添加回収実験

添加回収実験結果を図 2 に示す. (+)-カテキンとデキストリンを 1:1 で添加した場合では, 蒸留水<含水メタノール<含水エタノール<DMSO の順に (+)-カテキン量は高くなった. また (+)-カテキンとデキスト

リンを 1:3 で添加した場合では, 含水エタノール, 含水メタノールはほぼ同等の値を示したが, DMSO が最も効率よく (+)-カテキンを抽出することができた. DMSO を抽出溶媒にすることで, 添加した (+)-カテキンがほぼ確実に回収, 測定することができた.

3. 考 察

食品中の総ポリフェノール量を測定する方法として比色法は簡易的で優れている. 従来, Folin-Denis 法は赤ワインの総ポリフェノール定量法として用いられていたが, 赤ワインのエタノール含量である 15% 前後では十分にポリフェノールが抽出されていないことが懸念されていた. また蒸留水での抽出条件も検討されたが⁷⁾⁸⁾, これも十分な抽出は期待できないことが明らかとなった. 実際に抽出溶媒として含水エタノール溶液を用いた場合では, 蒸留水を用いた場合よりも明らかにポリフェノール値は高くなり, さらに 20~40% エタノールではさらに高い値を示した. これはその食品抽出物が 20~40% の濃度に最も効率よく溶解したことを意味する. 赤ワイン中にはエタノールが存在しているため, 赤ワイン抽出物にはエタノールに可溶性ポリフェノールが多く含まれていると考えられ, このことが 3 種の有機溶媒ではエタノールに対して最も高い値を示した要因と考察される. 一方, 含水アセトンや含水メタノールでは, 40~60% でピークとなったが, 含水エタノールよりは抽出効率は低かった.

これら 3 種の有機溶媒を比較した結果, 食品抽出物の種類によって, 最適な溶媒とその濃度が異なることが明らかとなった. これは食品抽出物中の溶解性と抽出溶媒の極性が関与しているものと思われる. すなわち, 緑茶抽出物のように極性の高い溶媒に溶けやすい物質は, メタノールなどの高極性溶媒に溶けやすく, イチョウ葉抽出物のように, 極性の低い溶媒に溶けやすい物質は, 極性の低いアセトンなどに溶けやすいことが考えられる. DMSO は非プロトン性の高極性の有機溶媒であり, あらゆる成分を溶解する性質を有する. その結果, 蒸留水, 含水エタノール, 含水メタノール, 含水アセトンを用い

図 1 異なる抽出溶媒による各食品抽出物中の総ポリフェノール量の比較

- エタノール
- メタノール
- ▲--- アセトン

エラーバーは平均値±標準偏差 (SD) で示した (n=3).

た場合よりも、さらに高いポリフェノール量を示したものと考えられる。

以上のことから、Folin-Denis 法における食品抽出物中の総ポリフェノール量は、抽出溶媒への溶解性の違いにより影響されることが明らかとなった。すなわち、実験試料をより完全に溶解させる溶媒を用いることで、試料中の正確なポリフェノール量を求めることができるものと思われる。

添加回収実験では、抽出溶媒に DMSO を用いることで添加した (+)-カテキンがほぼ回収できた。つまり DMSO で抽出した場合には試料の溶解性が向上したのに対し、蒸留水で抽出した場合には試料の溶解が不十分であり、その結果、ポリフェノール含量値に差が生じたものと推察された。緑茶抽出物中のポリフェノール含量を測定した結果では、含水エタノールよりも含水メタノールで抽出したほうが高い値を示した。しかしなが

図 2 添加回収実験

I (+)-カテキン：デキストリン＝1：1.

II (+)-カテキン：デキストリン＝1：3.

● エタノール

○---メタノール

エラーバーは平均値±標準偏差 (SD) で示した (n=3).

ら、(+)-カテキンとデキストリンを1:1で添加した添加回収実験では、含水エタノールのほうが(+)-カテキン量の測定値は高かった。これは緑茶ポリフェノールであるカテキン類でも、カテキン類の種類によって含水エタノールと含水メタノールへの溶解度に違いがあるためであろうと思われる。

以上の結果から、比色法によって総ポリフェノール量を測定する場合、測定に用いる抽出溶媒の違いで、得られるポリフェノール含量値には違いがみられ、その抽出溶媒にはDMSOが最適であることがわかった。これまで、測定者によってそれぞれ異なる溶媒を用いて総ポ

リフェノール量を求めてきたため、数値の比較が難しかった。DMSOを抽出溶媒にすることで、正確な総ポリフェノール量を測定することができることから、溶媒の違いによるポリフェノール測定値の差異は解消できることが明らかとなった。

4. 要 約

本実験ではFolin-Denis法の抽出溶媒の比較検討をおこなった。抽出溶媒には、蒸留水、各種濃度の含水メタノール、含水エタノール、含水アセトン、およびDMSOを用いた。

結果は各試料ごとに異なり、赤ワイン抽出物では含水

エタノール、緑茶抽出物では含水メタノール、イチョウ葉抽出物では含水アセトンが高い値を示したが、DMSOで抽出すると、いずれの試料を用いた場合でも最も高い値を示した。また添加回収実験では、DMSOで抽出した場合に添加した (+)-カテキンが最も効率よく回収できた。このことより、Folin-Denis 法における抽出溶媒には DMSO が最も適していることがわかった。

文 献

- 1) Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T. and Yoshida, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2581-2587 (2000).
- 2) Chang, Q., Zhu, M., Zou, Z., Chow, M. and Ho, W.K., *J. Chromatogr. B.*, **760**, 227-235 (2001).
- 3) Renard, C.M., Baron, A., Guyot, S. and Drilleau, J., *Int. J. Biol. Macromol.*, **29**, 115-125 (2001).
- 4) Merken, H.M. and Beecher, G.R., *J. Agric. Food. Chem.*, **48**, 577-599 (2000).
- 5) Jerumanis, J., *J. Inst. Brew.*, **91**, 250-252 (1985).
- 6) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉, 日食工誌, **41**, 611-618 (1994).
- 7) 濱渦康範, 飯島悦子, 食科工, **46**, 645-651 (1999).
- 8) 末松伸一, 久延義弘, 西郷英昭, 松田良子, 小松美博, 食科工, **42**, 419-424 (1995).
- 9) 長島万弓, 福田靖子, 伊藤龍平, 食科工, **46**, 382-388 (1999).
- 10) 清水和正, 前田裕一, 大澤謙二, 志村 進, 角田正健, 食科工, **48**, 238-245 (2001).
- 11) 西條了康, 武田善行, 食科工, **46**, 138-147 (1999).
- 12) 深井洋一, 松澤恒友, 食科工, **47**, 97-104 (2000).
- 13) Cancalon, P.F., *J. AOAC. Int.*, **82**, 95-106 (1999).
- 14) Watanabe, T., Yamamoto, A., Nagai, S. and Terabe, S., *J. Chromatogr. A.*, **793**, 409-413 (1998).
- 15) 堀江秀樹, 氏原ともみ, 木幡勝則, 植松宏彰, 中島 隆, 広本光雄, 垣内 隆, 食科工, **48**, 586-590 (2001).
- 16) Folin, O. and Denis, W., *J. Biol. Chem.*, **22**, 305-308 (1915).
- 17) Beecher, G.R., Warden, B.A. and Merken, H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 267-270 (1999).
- 18) Wan, X., *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **41**, 400-401 (2001).
- 19) Appel, H.M., Govenor, H.L., Ascenzo, M., Siska, E. and Schultz, J.C., *J. Chem. Ecol.*, **27**, 761-778 (2001).
- 20) Tanaka, N., Shimomura, K. and Ishimaru, K., 日食化誌, **6**, 48-51 (1999).

(平成 14 年 1 月 9 日受付, 平成 14 年 4 月 4 日受理)