

オリーブオイル抽出溶液の調製とポリフェノール分析

主任研究員 朝日信吉

1. 緒言

平成 27 年 4 月から始まった機能性表示食品制度が注目されており、既に県内企業のいくつかの商品について機能性表示が認められている。主要な県産品であるオリーブオイルについても、様々な機能性が注目されている。本研究では、機能性の調査に必要なオリーブオイル分析のうち、オリーブオイル抽出方法、総ポリフェノール量測定、HPLC 測定条件の検討を行った結果を報告する。

2. オリーブポリフェノールの抽出

2-1. 抽出方法の検討

オリーブオイルからポリフェノールの抽出を行うために、抽出方法の検討を行った。文献による方法 (No.1~9) と本研究による方法 (No.10) をまとめたものを表に示す。抽出はいずれも室温で行われているが、文献により、抽出条件は様々であった。抽出溶媒については、80%メタノール水溶液を採用している文献が多いことや、メタノール濃度を変化させて行った総ポリフェノール量測定により、抽出効率が最適と思われる 80%メタノール水溶液を用いることにした。ヘキサンは、溶媒による抽出時、オリーブオイルの粘性を下げるために用いる。本研究では、オリーブオイル 3g に対し、0.6mL のヘキサンを用いている。これ以上の量のヘキサンを添加した場合、オリーブオイル相の比重が 80%メタノール相よりも小さくなって下相から上相へと変化し、操作性が悪くなることがわかった。オリーブオイル相は、ボルテックスミキサーで攪拌して抽出溶媒とよくなじませた後、さらに乳化を促進させるため、超音波で抽出操作を行うことにした。抽出回数は 3 回で、6mL となった抽出液を 10mL に定容して供試溶液とした。

表 1. オリーブオイルの抽出方法

No.	抽出方法	オリーブオイル/g	ヘキサン/mL	抽出溶媒	抽出回数	抽出溶媒量(合計)/mL	抽出時間(合計)/分	文献
1	超音波	2.0	—	80% MeOH aq.	1	6.0	15	[1]
2	攪拌	0.6	—	DMF	3	1.8	—	[2]
3	攪拌	0.5	0.5	80% MeOH aq.	2	1.0	—	[3]
4	攪拌	5.0	2.0	70% MeOH aq.	1	2.0	10	[4]
5	攪拌	—	+	60% MeOH aq.	3	—	—	[5]
6	攪拌	30	—	MeOH または 80% MeOH aq.	3	90	—	[6]
7	攪拌	2.5	5.0	60% MeOH aq.	1	—	2	[7]
8	超音波	10	10	MeOH	3	15	30	[8]
9	攪拌	25	—	70% EtOH aq. + HCOOH	1	75	—	[9]
10	攪拌,	3.0	0.6	80% MeOH aq.	3	6.0	45	本研究

	超音波						
--	-----	--	--	--	--	--	--

2-2. オリーブポリフェノールの抽出方法

検討の結果、オリーブポリフェノールの抽出プロトコルを以下のように定めた：

1. オリーブオイル 3g を 15mL 遠心管（透明型）に計り取り、n-ヘキサン 0.6mL を加える。
2. 80%メタノール水溶液 2mL を加え、5 分間振盪する（Vortex ミキサーにより、3,000rpm, 5 分間）。
3. 振盪完了後、直ちに混合液を 15 分間、超音波処理を行って室温で抽出する。
4. 遠心分離（3,500rpm×10 分間）を行い、水-メタノール相（上相）を回収する。
5. 残ったオイル-ヘキサン相に対し、抽出操作 2～4 をもう 2 回行い、合計 6mL の水-メタノール相を回収する。
6. 回収した水-メタノール相は、15mL 遠心管に移し合わせる。
7. 回収した水-メタノール相に 3mL のヘキサンを加え、1 分間振盪してメタノール相をヘキサン洗浄する。
8. 遠心分離（3,500rpm×5 分間）を行った後、ヘキサン相を除去する。
9. 洗浄した水-メタノール相を回収し、80%メタノール水溶液で 10mL に定容して、供試溶液とする。

3. 総ポリフェノール量測定

3-1. 総ポリフェノール量測定

得られた抽出溶液の総ポリフェノール量測定は、文献 [10] を参考にして以下の手順で行った。サンプル 1mL を 50mL のメスフラスコに入れ、20mL の水で希釈した。2.5mL の Folin-Ciocalteu 試薬を入れてよくかき混ぜた後、15mL の 10wt% Na₂CO₃ 水溶液を加えた。水を加えて 50mL にし、よく混合して 1 時間以上放置した。この処理溶液を 765nm の UV-可視分光法によって吸光度測定を行うことで、総ポリフェノール量の定量を行った。定量のための検量線は、ポリフェノールの標準試薬としてカフェ酸の 80%メタノール水溶液を用い、上記と同様の方法で処理し、吸光度測定を行うことにより作成した。

3-2. 総ポリフェノール量測定結果

カフェ酸換算の総ポリフェノール量測定結果を表 2 に示す。様々な産地・銘柄のものを測定した。支援企業のサンプルは、No.7～12 に示した。品種、収穫時期、方法にもよって値は異なるが、日本産では 140～275mg/kg という値が得られた。

表2. オリーブオイルの総ポリフェノール量

No.	オリーブオイルサンプル	総ポリフェノール量/mg・kg ⁻¹
1	ギリシャ産	234
2	オーストラリア産	158
3	アルゼンチン産	128
4	イギリス産	198
5	イタリア産	328
6	スペイン産	267
7	日本産 1	254
8	日本産 2	160
9	日本産 3	140
10	日本産 4	205
11	日本産 5	179
12	日本産 6	275

4. オリーブ抽出溶液の HPLC 測定

HPLC 分析条件は、国際オリーブ協会 (IOC) のドキュメント [1] を改変して以下のように設定した:

HPLC 分析条件

HPLC 装置: 日立 L-7000 シリーズ

カラム: Phenomenex, Kinetex 5 μm C18 100 Å (4.6 mm x 25 cm)

溶離液流量: 1.0mL/分

カラム温度: 40°C

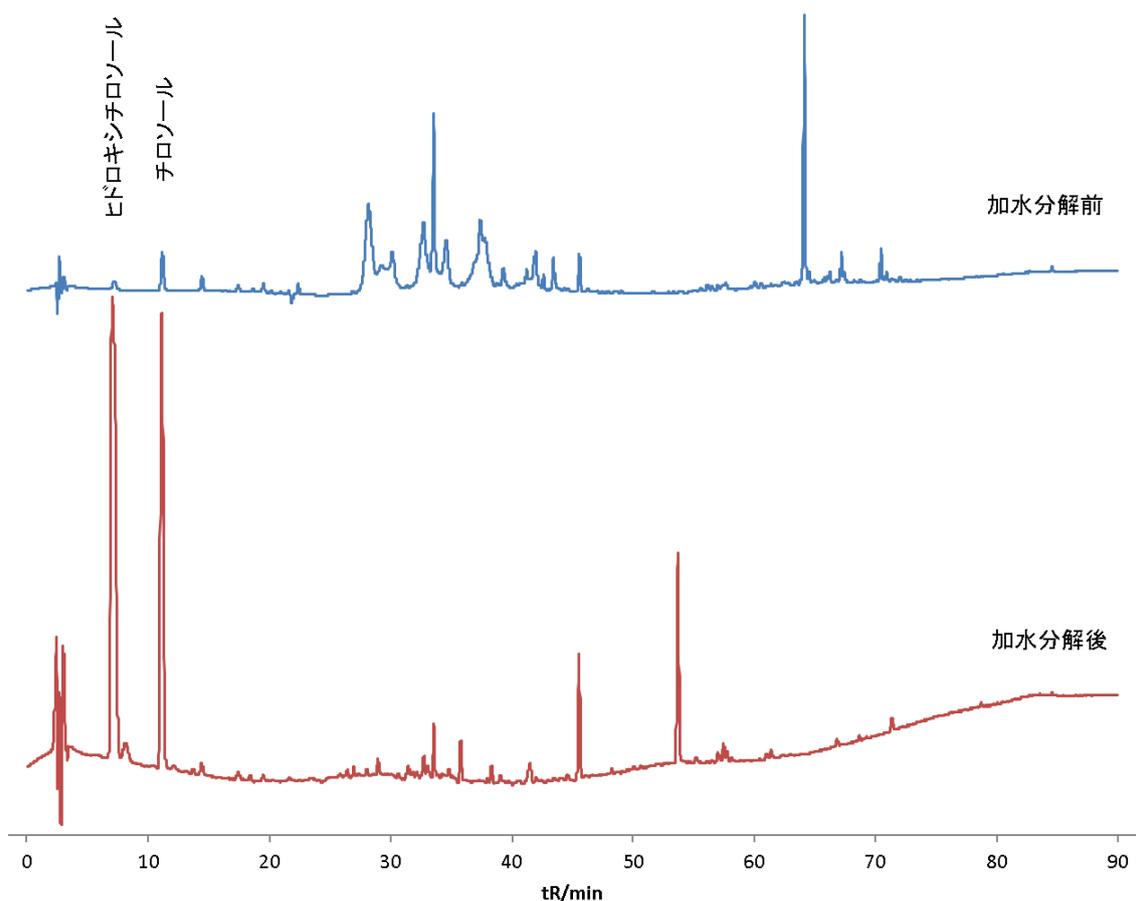
測定波長: 280nm

溶離液: (A) 0.1 % ギ酸水溶液, (B) メタノール/アセトニトリル=1/1

表3. グラジエントプログラム

時間 /分	A/% 0.1 % HCOOH aq.	B/% MeOH:MeCN=1:1
0	96	4
80	0	100
90	0	100
92	96	4
107	96	4

図1. オリーブオイル抽出液（日本産1）のLCクロマトグラム



オリーブオイル抽出液（日本産1）の加水分解前後のLCクロマトグラム結果を図1に示す。加水分解後のLCクロマトグラムは、抽出液を0.5M硫酸で80℃、2時間分解した溶液のものである。クロマトグラムの保持時間9.5分と13.1分に、それぞれヒドロキシチロソールとチロソールのピークが観察された。加水分解前にあった30～40分のピークは、加水分解後に大部分が消失し、ヒドロキシチロソールとチロソールのピークが大きくなっていることから、オレウロペインアグリコンとリグストロシドアグリコン、およびそれらの異性体であると考えられた。

ヒドロキシチロソールとチロソールの標準溶液を調製し、HPLC測定でオリーブオイル抽出液の定量を行った結果を表4に示す。日本産の抽出液には、ヒドロキシチロソール、チロソールが外国産よりも低い濃度で含まれていた。これは、入手した日本産のオリーブオイルが収穫直後の新鮮なものであり、アグリコンの加水分解が起きていないためであると考えられた。

表4. オリーブオイル中のポリフェノール成分の濃度

No.	オリーブオイルサンプル	ヒドロキシチロソール 濃度/mg・kg ⁻¹	チロソール 濃度/mg・kg ⁻¹
1	ギリシャ産	33.3	35.6
2	オーストラリア産	15.1	15.7
3	アルゼンチン産	5.5	7.0
4	イギリス産	17.8	17.7
5	イタリア産	12.0	21.6
6	スペイン産	15.2	21.4
7	日本産 1	1.6	4.9
8	日本産 2	4.7	4.9
9	日本産 3	5.3	11.0
10	日本産 4	8.3	9.9
11	日本産 5	9.2	13.4
12	日本産 6	3.8	9.9

5. まとめ

オリーブオイルの抽出液調製は、オイルにヘキサンを添加して粘性を下げた後、80%メタノール水溶液を用いて振盪と超音波処理によって行った。得られた抽出液の総ポリフェノール量測定と HPLC 測定を行った。オリーブオイルの総ポリフェノール量は、日本産と外国産で大きな違いは見られなかった。HPLC 測定により、ヒドロキシチロソール、チロソールの定量を行った。日本産 1 の加水分解前後 LC クロマトグラムの比較から、30~40 分のピークがオレウロペインアグリコン、リグストロシドアグリコン、およびそれらの異性体であることが明らかとなった。

参考文献

- [1] IOC Document COI/T.20/Doc. No.29, Nov. 2009.
- [2] J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 9017-9022.
- [3] Grasas y Aceites, 2010, 61, 45-51.
- [4] J. Food. Sci. 2009, 74, C177-183.
- [5] Food. Chem. 2002, 78, 207-211.
- [6] J. Agric. Food Chem. 1995, 43, 1802-1807.
- [7] J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 2459-2461.
- [8] J. Agric. Food Chem. 2015, 63, 3859-3872.
- [9] J. Sci. Food Agric. 2006, 86, 757-764.
- [10] J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 9225-9229.