

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

四国地域イノベーション創出協議会
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

柑橘の γ -アミノ酪酸

作成者：愛媛県産業技術研究所

食品産業技術センター主任研究員 大野一仁

1. 柑橘について

1. 1 概要

四国は全国有数の柑橘生産地域である。柑橘栽培に適した温暖な気候風土を背景に、多くの種類の柑橘が栽培されている。

愛媛県においては、温州ミカンが戦後特に昭和30年代～40年代にかけて需要の拡大に適応して、栽培面積・生産量が急増し、昭和43年には、全国1位の生産量を誇った。その後、需要の低迷もあり生産量は減少したが、現在でも和歌山について全国2位の生産量を有する。その他、イヨカン（全国1位）、夏ミカン（全国2位）、ハッサク（全国3位）、ネーブル（全国4位）、ポンカン、清見、不知火、河内晩柑等種々の柑橘が栽培されている。また、徳島県ではスダチ（全国1位）、高知県ではユズ（全国1位）が生産されそれぞれ地域の重要な特産果実となっている。

これらの柑橘は生果として販売されているだけではなく、加工品としても利用されている。地元の加工業者が、特産柑橘類を原料として、果汁、シラップ漬、果皮加工品、菓子素材、ジャム類等多品種の加工品を製造している。これまでは、製品の品質（外観や食味、香りがよいこと、つまり、収穫直後の生果実に近い製品開発）に力が注がれてきた。しかし、消費者の健康志向を背景に、柑橘類に含まれている健康維持に役立つ成分（たとえば、 β -クリプトキサンチン、ノビレチンやヘスペリジン等）の機能性や作用機構が解明され、これらの成分を生かした商品が開発され、柑橘加工品製造業者も柑橘の機能性成分を生かした商品作りへの関心が高まってきている。

1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

γ -アミノ酪酸（GABA）は、動物、植物等に広く分布している遊離アミノ酸の一種で、哺乳類の小脳や脊髄に存在し神経の主要な抑制性伝達物質として、脳細胞の代謝機能を促進させている。そのため、医薬品として脳卒中後遺症、脳動脈硬化症、頭部外傷後遺症に伴う諸症状（頭痛、頭重、易疲労性、のぼせ感、耳鳴、記憶障害等）の治療に用いられている。また、血圧上昇抑制作用があることから、食品の機能性成分としても注目されている。

この機能を生かした食品開発が盛んに行われている。緑茶を用いて γ -アミノ酪酸

を高濃度に蓄積したギャバロン茶、発芽玄米、さらに特定保健用食品として「血圧が高めの方に適する」と表示が許された乳酸菌飲料、カボチャを用いたギャバ富化素材が市場に投入され消費者の関心を集めている。また、最近では、ストレスを軽減したり、精神的な癒しの効果が注目されている。

γ -アミノ酪酸は、果実中に遊離アミノ酸として含まれている。著者らは、果実中の含量について測定した。その結果、最も含量が低いナシの 0.1mg/100g から温州ミカン（貯蔵）、オレンジの 30mg/100g まで、全ての果実に含まれていた。果実の中では、柑橘に比較的多く含まれていた。可食部中に 10 mg/100g 以上含まれているのは、柑橘とブドウとバナナだけであった。柑橘中の γ -アミノ酪酸含量は、ハッサクの 6 mg/100g から温州ミカン、オレンジの 30mg/100g までで、多くが 10 mg/100g 以上であった。ポンカン、清見、ユズは、20 mg/100g 以上含まれていた。

このように、柑橘類に多く含まれていること、特に温州ミカンでは貯蔵中に顕著に増加することから、愛媛県産業技術研究所では、温州ミカンの γ -アミノ酪酸生成能力に注目して、 γ -アミノ酪酸を温州ミカンを用いて富化する技術を開発した。温州ミカン果肉で γ -アミノ酪酸を富化して“GABAリッチピューレー”を調製し、ミカンパンとして利用されている。



写真 1-1 GABAリッチピューレー



写真 1-2 GABAリッチピューレーを用いた加工品

(試作品：菓子パン、食パン、ジャム)

1. 2. 1 γ -アミノ酪酸を含む食品

γ -アミノ酪酸は、ほとんどの食品に含まれている。

野菜類では、種類により含量は異なり、1~50mg/100g の範囲にある。ナス、ミニトマト、カラシナ、ニンジンが高く 20mg/100g 以上含まれている。特にナスでは、松山長ナスが 50 mg/100g、絹皮が 48 mg/100g、水ナス・丸ナスが 33 mg/100g と、他の野

菜に比べて高い傾向にある。

加工品である漬物にも比較的多く含まれている。市販の漬物 56 点について調査したところ、 γ -アミノ酪酸は全ての漬物に含まれており、含量は 1~200mg/100g で、平均 51mg/100g であった。100mg/100g 以上あったのは 9 点で、そのうち 7 点がナス、残りが、ダイコン、カブの浅漬または、もろみ漬であった。このことから、漬け方としては、浅漬が高い傾向にあった。ナスの塩漬(浅漬)でも、53~200 mg/100g(平均 120 mg/100g)とかなりのばらつきがあることから、原料や加工方法により、 γ -アミノ酪酸の生成量が異なる結果であった。

漬物以外の加工品についても、 γ -アミノ酪酸の機能性に着目し、 γ -アミノ酪酸富化させた食品や食品素材も開発されている。お茶、米糠・胚芽、玄米、胚芽米、大豆もやし、カボチャ、アブラナ科植物、麦若葉、クロレラ等の植物の有する酵素を利用した方法、アガリクス酵母、乳酸菌、麹菌、テンペ菌等微生物が産生する酵素を利用する様々な方法が開発されているが、いずれの方法も、グルタミン酸がグルタミン酸デカルボキシラーゼによって γ -アミノ酪酸に変換する反応を利用している。

現在 γ -アミノ酪酸を富化した製品が多く販売されているが、その多くは乳酸菌発酵を利用したもので、発酵によって得られた高濃度素材(乾燥粉末、エキス)を食品に添加する方法がとられている。

愛媛県産業技術研究所では、従来、基質として多く用いられてきたL-グルタミン酸ナトリウムではなく、水に溶解しにくいL-グルタミン酸を基質として用い、発酵終了時に10%以上の γ -アミノ酪酸を含有する製造技術を開発している(特許出願中)。また、これまでに、野菜、果実が有する γ -アミノ酪酸生成能力を利用して、高濃度に γ -アミノ酪酸を蓄積したナスの低塩漬物、ミカンピューレー、パン、ジャム等を開発してきた。

<引用・参考文献>

1. 大森正司、矢野とし子、岡本順子、津志田藤二郎、村井敏信、樋口満：農化、61, 1449-1451(1987)。
2. 松村敬一郎編：茶の科学(第8刷)、朝倉書店、P171-173(1997)。
3. 戸枝一喜：植物資源の生理活性物質ハンドブック、590-593(1998)。
4. 松本恭郎、大野一仁、平岡芳信：愛媛工技研報告、35, 97-100 (1997)。
5. 松本恭郎、大野一仁、別所康守、平岡芳信：愛媛工技研報告、35, 73-77 (1998)。
6. 大野一仁、首藤喬一、串井光雄、門家重治、松本恭郎：愛媛工技研報告、41, 14-20 (2003)。
7. 大野一仁、松長崇、佐野和男：愛媛県工業系研究報告、46, 26-30 (2008)。

2. γ -アミノ酪酸についての説明

γ -アミノ酪酸は、遊離アミノ酸の一種で、その化学名(γ -Amino Butyric Acid)の頭文字をとってGABA(ギャバ)と呼ばれている。白色の結晶で僅かに苦味を有する。水又は酢酸には溶けやすくメタノールには溶けにくく、エーテル又はク

ロロホルムにはほとんど溶けない。

熱安定性は比較的高く、湯通し(100℃-60分間)やオートクレーブ処理(121℃-15分間)ではほとんど分解しないが、140℃以上の焙煎処理では分解が進行する。

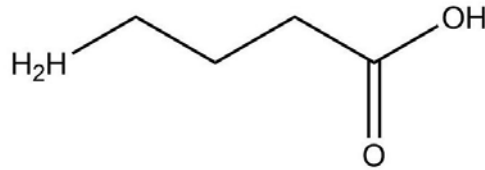


図 2 - 1 γ -アミノ酪酸の構造式

3. 定量分析の方法について

柑橘類及び柑橘加工品中の γ -アミノ酪酸を高速液体クロマトグラフィーにより定量する方法を述べる。

アミノ酸のHPLC分析方法には、ポストカラム法(ニンヒドリン法、OPA法)、プレカラム法がある。従来、食品分野では、感度は高くないものの定量精度(再現性)がよく、分離可能なアミノ酸数の多いニンヒドリン法が採用されてきた。しかし、たんぱく質を構成している18種類のアミノ酸以外にも γ -アミノ酪酸、ヒドロキシプロリン等のアミノ酸も含まれていることから、これらのアミノ酸を同時に効率よく分析するためには、使用する溶離液の種類やカラム温度を時間経過とともに詳細に設定した分析プログラムで装置を運転する必要があるため、分析に長時間(1試料あたり2~2.5時間)を要してしまう。昼夜の連続運転をしても試料数が限られ反復試験が困難であることから、短時間に分析できる方法が望まれていた。

ところが、最近の分析技術の進歩により、多種類のアミノ酸を極めて短時間(10分間程度)で分析可能できるアミノ酸用の高速分析システムが開発され、実用機として研究機関等に導入されるようになってきた。

本マニュアルで使用するシステムは、誘導化試薬としてNBD-F(4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole)を用いて誘導体化し、逆相(ODS)カラムを用いて短時間(1サイクル約10分間)での分析が可能となった。

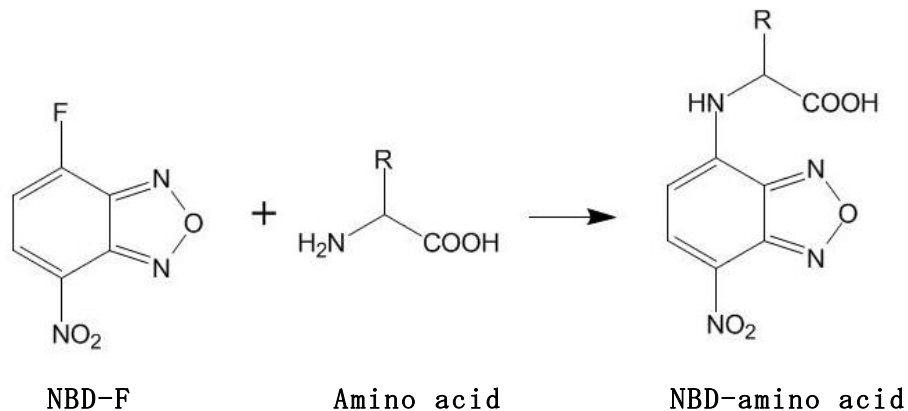


図 3 - 1 アミノ酸のNBD-Fとの反応(誘導体化反応)

3. 1 準備する器具など

1. 超音波発生器
2. 恒温水槽 (50℃～60℃セットできること)
3. エバポレーター
4. ビーカー100ml 容
5. 共栓三角フラスコ 100ml 容
6. メスフラスコ 100ml 容
7. メスフラスコ 10ml 容
8. ナス型フラスコ 100ml 容
9. 試料濾過用メンブランフィルター(セルロースアセテート膜を使用したもの、ポアサイズ 0.20 μ m、25mm 径：D I S M I C、25CS020AN, アトバンテック社製)
10. ピペッター(10～1,000 μ l)
11. エッペンチューブ(2ml 容)
12. タッチミキサー
13. 分析装置
アミノ酸高速分析システム (超高速HPLCシステム)
14. 分析用カラム
同上システムに対応した超高速アミノ酸分析用カラム (ZORBAX SB-C18(1.8 μ m、3×50mm))

[試薬]

1. ジエチルエーテル(試薬特級)
2. エチルアルコール(試薬特級)
3. 0.02mol/L 塩酸 (特級濃塩酸を超純水で希釈)
4. アミノ酸標準混合液
 γ -アミノ酪酸(試薬特級)、トリプトファン(試薬特級)を、各々0.02mol/L 塩酸で溶解し 2.5mmol/L の標準原液を調製する。
アミノ酸混合標準液H型(2.5mmol/L、和光純薬工業株)及び調製した γ -アミノ酪酸標準原液、トリプトファン標準原液を各々1ml ずつ取り、0.02mol/L 塩酸で25ml に定容する(0.1mmol/L)。標準原液、調製したアミノ酸標準混合液は、5℃以下で保存する。
6. 専用溶離液
超高速アミノ酸分析用溶離液 A
超高速アミノ酸分析用溶離液 B
7. 誘導体化試薬 一式
NBD-F による誘導体化試薬セット
超高速アミノ酸分析用反応緩衝液
超高速アミノ酸分析用反応中和液
超高速アミノ酸分析用反応試薬
超高速アミノ酸分析用反応試薬溶解液

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

(1) 試料の調製

1. 果汁、または、固形食品の均質化試料5gを100ml容ビーカーに秤り取り、80%エタノール約を70ml加えてホモジナイザーで磨砕する。
2. 磨砕溶液を200ml容共栓三角フラスコに取り、超音波処理を5分間した後、50℃の恒温水槽で1時間加温抽出する。
3. 室温まで冷却後、80%エタノールで100mlに定容する。
4. ろ紙 (No. 5B) でろ過する。
5. ろ液の1~20mlを取り、100ml容ナス型フラスコに取る。
6. エバポレータでエタノールを除去する。
7. ジエチルエーテルを10ml加えて混合する。しばらく静置し、色素が移った上層(エーテル層)をパスツールピペットで除去する。上層が着色しなくなるまでこの操作を繰り返して色素等の脂溶性物質を除去する。
8. エバポレータで残留するジエチルエーテルを完全に除去し、乾固させる。
9. 0.02mol/L塩酸で10mlに定容する。
10. 孔径0.20 μ mのメンブランフィルターでろ過して分析用試料溶液とする。

(2) 誘導体化処理

1. 調製した試料溶液、または、アミノ酸標準混合液 (0.1mmol/L) 20 μ l を反応用エッペンチューブに入れる。
2. これに、反応緩衝液 160 μ l 加える。
3. さらに、反応試薬 20 μ l を加え、タッチミキサーで攪拌する。
4. 反応用エッペンチューブを 60℃の恒温水槽に浸し、正確に1分間加温する。
5. 反応用エッペンチューブに反応中和液を 800 μ l 加えてタッチミキサーで攪拌し反応を停止させる (全部で容量は、1,000 μ l となる)。
6. 反応液を、反応用エッペンチューブから、褐色バイヤルに移す。
7. 分析装置のオートサンプラーにセットする。

3. 3 アミノ酸高速分析システム (超高速HPLCシステム)

(1) 移動相の調製

移動相は、専用の溶液2種 (A、B) を使用する。

超高速アミノ酸分析用溶離液A、超高速アミノ酸分析用溶離液Bは、(株)日立ハイテクノロジーズ製のものをを用いる。

(2) 分析条件

- ① 検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。
検出波長:470nm
恒温槽:37℃
流量:移動相A、移動相Bの合計で毎分0.55ml
試料注入量:10 μ l
- ② 移動相溶媒の混合比(グラジエント)は以下のように調整する。

時間(分)	溶離液 A (%)	溶離液 B (%)
0. 0	8 5. 0	1 5. 0
2. 7	7 3. 0	2 7. 0
6. 2	6 5. 0	3 5. 0
7. 2	3 0. 0	7 0. 0
7. 3	8 5. 0	1 5. 0
7. 8	8 5. 0	1 5. 0

(3) 定性及び定量

- ① 分離された物質の定性は保持時間により行う。
- ② 定量は標準試料を用いた、内標を用いない絶対検量線法による。通常はクロマトグラムの面積から計算するが、微量物質の場合はピーク高を用いる方が精度良く定量出来る場合もあるので、計算に用いる装置の特性に注意を払って選択することが必要である。

4. 分析例

4. 1 アミノ酸高速分析システムによる分析例と定量分析結果

分離された物質は保持時間から(標準物質と比べ)特定する。定量には標準試料を用い、クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。以下に典型的なクロマトグラムを図に示す。

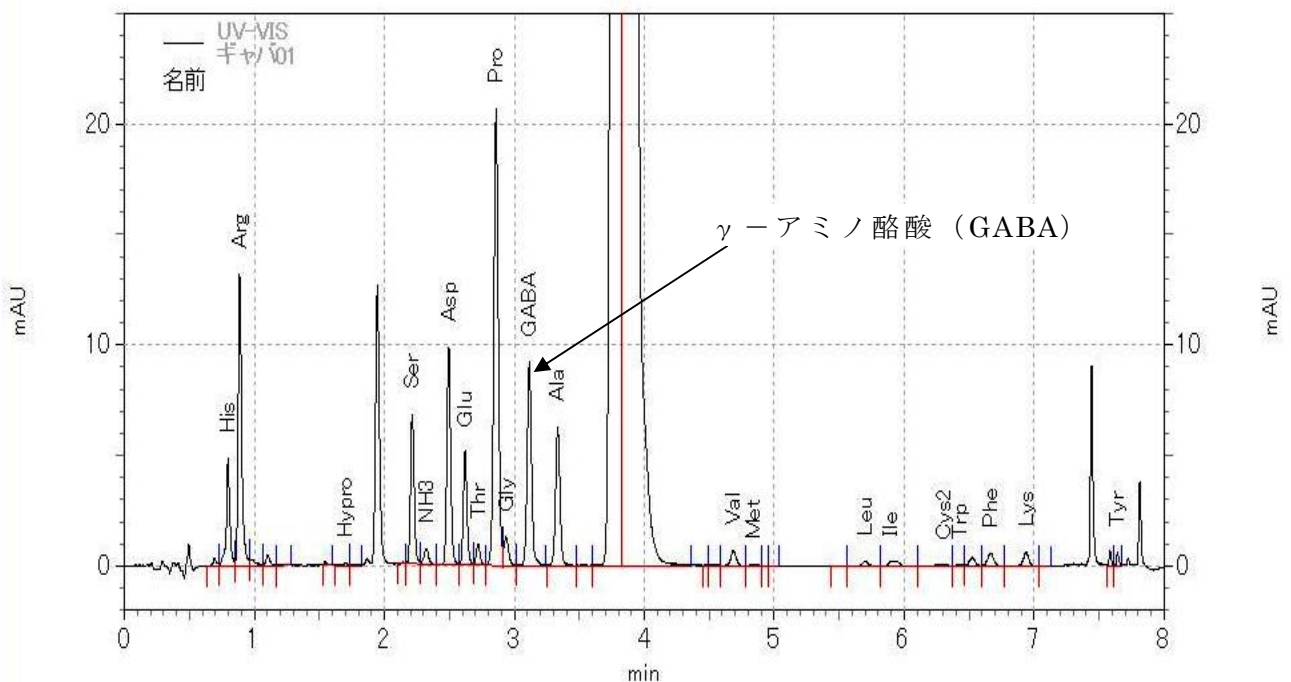


図 4. 1-1 温州ミカン果汁のクロマトグラム

5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、県内産カンキツ果汁及びその加工品中 γ -アミノ酪酸の定量分析を行った。その結果、の順番に多く含まれていた。下記表に示す。

表 5-1 県内産カンキツ及び加工品の定量結果

試料	γ -アミノ酪酸 超高速 HPLC 法 (mg/100g)	γ -アミノ酪酸 従来法(ニンヒドリン 法、mg/100g)
温州ミカン果汁	12.9	14.2
温州ミカン果汁	13.5	14.3
清見果汁	30.2	30.3
清見果汁	38.5	34.5
ユズ果汁	21.5	22.5
ブラッドオレンジ果汁	25.1	25.2
温州ミカンシラップ漬	23.4	20.9
伊予柑シラップ漬	12.2	12.3
ミカン果皮乾燥粉末	180	178
ミカンギャバ富化ペースト	392	391

(※注意) なおこの測定結果は数多くの柑橘及びその加工品のうちの一例であり、果実、加工品一般の分析結果ではない。

6. 分析上の留意、注意点

NBD-Fによる誘導体化試薬は、温度・光により劣化するので、使用後は速やかに密栓し、遮光・10℃以下で保存する必要がある。

また、誘導体化処理では、各操作の時間の違いで、反応の度合いに差が出る可能性があるため、できれば特定の人が連続して処理した試料について分析することが望ましい。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1. C. Aoyama, T. Santa, M. Tsunida, T. Fukushima, C. Kitada and K. Imai, Biomed. Chromatogr., 18, 630-636 (2004).

—以上—

[トップページに戻る](#)