

タマネギのケルセチン分析法

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 渡辺 純

【はじめに】

フラボノイドは、植物二次代謝産物であるポリフェノール中の一類の化合物であり、植物の成長や生体防御に重要な役割を果たしている。タマネギにはフラボノイドが豊富に含まれ、我々の食生活上主要なポリフェノール摂取源となっている¹⁾。タマネギ中の主要なフラボノイドはケルセチン配糖体であり、タマネギ中のフラボノイドの約8割を占める²⁾。ケルセチンあるいはその類縁体には、がん細胞の増殖抑制³⁾、抗酸化性⁴⁾などの健康増進作用が報告され、注目されている。

タマネギ中のポリフェノール含有量は、品種、栽培条件、収穫期、流通・加工形態により変動する。筆者らは北海道産タマネギに含まれるケルセチンを品種間で比較し、「クエルゴールド」がケルセチン高含有品種であることを報告している⁵⁾。妥当性の確認されたタマネギ中のケルセチン含有量測定法を用いることにより、ケルセチン高含有品種の選抜、含有量をも高める栽培法の確立につながることを期待される。イチョウ葉中のケルセチンをはじめとするフラボノール含有量の妥当性の確認された測定法として AOAC 法 (Official Methods of Analysis of AOAC International 2006.07) が報告されている。本プロトコールは、AOAC 法をタマネギのケルセチン含有量分析用に改変したものであり、ケルセチンを始めとするフラボノール配糖体を網羅的にアグリコンに分解し、HPLC により定量する。したがって、ケルセチン含有量はアグリコン換算量となる。本プロトコールによる分析法は室間共同試験により妥当性を確認している⁶⁾。また、添加回収試験により真度の確認をあわせて実施している⁶⁾。

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- HPLC システム (ポンプ、オートサンプラー、カラムオーブン、UV 検出器を備えたもの。データ処理可能なコンピュータ)
- HPLC カラム (内径 4.6 × 250 mm、粒子径 5 μm の逆相 ODS カラム (例えば、Phenomenex Prodigy ODS(3), 5 μm, 100Å, 4.6 × 250 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA; Part No. 00G-4097-E0))
- 超音波洗浄槽 (標準的なもの、温調の有無は問わない)
- 電子天秤 (校正済みのもの、0.1 mg の単位まで測定可能なもの)
- 分光光度計 (光路長 1 cm のセルを用いて、361 nm の吸収が測定可能なもの)
- 石英ガラスセル (光路長 1 cm のもの)
- シリンジあるいは自動ピペッター (標準液調製用、0.1, 0.25, 1.0 および 2 mL が計量可能なもの。1.0 および 2 mL のものは全量ピペット (クラス A) で代用可能。)
- 自動ピペッターあるいはオートビュレット (希釈液分注用。12 mL が計量可能なもの)
- 全量フラスコ (6 mL, 10 mL, 20 mL あるいは 25 mL, 50 mL、クラス A)
- メスシリンダー (移動相・希釈液調製用、クラス A)

- セラムバイアル (30 mL、内径 13 mm × 外径 20 mm、例えば、アズワン バイアル瓶 30 mL, #5-111-06)
- バイアルキャップ (アルミ製シールつきクリンプキャップ、外径 20 mm (上記例のバイアル瓶には付属している))
- シリコンセプタム (テフロン表面加工、外径 20 mm (例：アズワン バイアル瓶用パッキン, #5-112-05))
- シリンジトップフィルター (孔径 0.45 μm 、PVDF メンブレン)
- シリンジ (ルアーロック式、3 mL プラスチック製ディスポーザブル)
- 実験室用オーブン (80-100°C に温調可能なもの)
- 褐色びん (高密度ポリプロピレン (HDPE) 製の蓋がつき、ガラス製の広口でスクリュウキャップのもの)
- オートサンプラー用バイアル (2 mL 褐色あるいは透明のガラス製でスクリュウキャップのもの)
- 温度計 (少なくとも 50-100°C の温度が測定可能なもの)
- 凍結乾燥機
- 粉砕機 (タマネギ凍結乾燥物を粉末化可能なもの、例えば、Retsch GM-200)
- ボルテックスミキサー

2. 試薬

- ケルセチン 2 水和物
- メタノール (HPLC グレード)
- エタノール (99.5 %)
- ジメチルスルホキシド (DMSO)
- リン酸 (85%、ACS グレード)
- 塩化水素 (37 %、微量金属グレード)
- 水 (脱イオン水、HPLC グレードあるいは nanopure グレード)
- 液体窒素

3. 調合・調整

- 1) 移動相 メタノール-0.85 %リン酸 (1:1, v/v)。以下、1 L を調製する場合の例
 - メタノールを 500 mL メスシリンダーで量り取る。
 - 水約 250 mL を別のメスシリンダーに量り取り、そこにリン酸 5 mL (85-87 %) をメスピペットで量り取って加え、さらに水で 500 mL とする。
 - この 2 液を混合して、1 L の容器に入れ、超音波洗浄槽を用いて脱気する。
 - 「移動相」とラベルする。
- 2) 希釈液 エタノール-水-塩酸 (50 + 20 + 8, v/v/v)。
 - 水 40 mL をメスシリンダーで量り取り、200 mL 三角フラスコに移す。
 - メスシリンダーで量り取ったエタノール 100 mL を加える。
 - さらに、注意深く塩酸 16 mL をピペットで量り取って加え、よく混合する。
 - 「希釈液」とラベルする。

- 3) 標準溶液保存液 おおよそのケルセチン濃度は 1.2 mM である。
- ケルセチン 2 水和物 21 mg (± 0.6 mg)を精秤し、50 mL 全量フラスコに移す。
 - 約 10 mL の DMSO を全量フラスコに加え、室温で 1~5 分間超音波処理して標準品を溶解する。
 - メタノールで 50 mL に定容し、転倒混和する。
 - 「保存液」とラベルする。保存液は蓋がきっちりされた褐色容器で冷蔵保存した場合、6 ヶ月間安定である。

4) 標準液

- 保存液を表 1 に従って、全量フラスコに量り取ってメタノールで希釈する。
- 標準液 1 の 361 nm の紫外部吸収を分光光度計と 1 cm 光路長のセルを用いて測定する。この際、メタノールを対照として用いて補正する。
- ケルセチンのモル吸光係数の常用対数 4.34 を用いてケルセチン標準溶液保存液および標準液の濃度を補正する。標準溶液保存液の濃度は、標準液 1 の吸光度 $\div (2.19 \times 10^{-2}) \times 40$ となる。
- それぞれの標準液には 1~5 の番号を付し、各標準液は 4 °C で保存し、使用前に室温に戻す。

表 1 標準液の標準液保存液からの調製

| 標準液 | 標準液保存液 (mL) | 最終溶液量 (mL) | おおよそのケルセチン濃度 (μM) ^{*1} |
|-----|----------------|------------|--|
| 1 | 0.25 | 10.0 | 30 |
| 2 | 0.5 | 10.0 | 60 |
| 3 | 1.0 | 10.0 | 120 |
| 4 | 1.0 | 5.0 | 240 |
| 5 | 2.0 | 5.0 | 480 |

*1 ケルセチンのモル吸光係数の常用対数 4.34 を用いてケルセチン標準溶液保存液および標準液の濃度を補正する。標準溶液保存液の濃度は、標準液 1 の吸光度 $\div (2.19 \times 10^{-2}) \times 40$ となる

5) HPLC 分析条件

カラム温度 35 °C、流速 1.0 mL/min、注入量 10 μL 、検出波長 370 nm、分析時間 35 分

典型的なクロマトグラムを図 1 に示す。

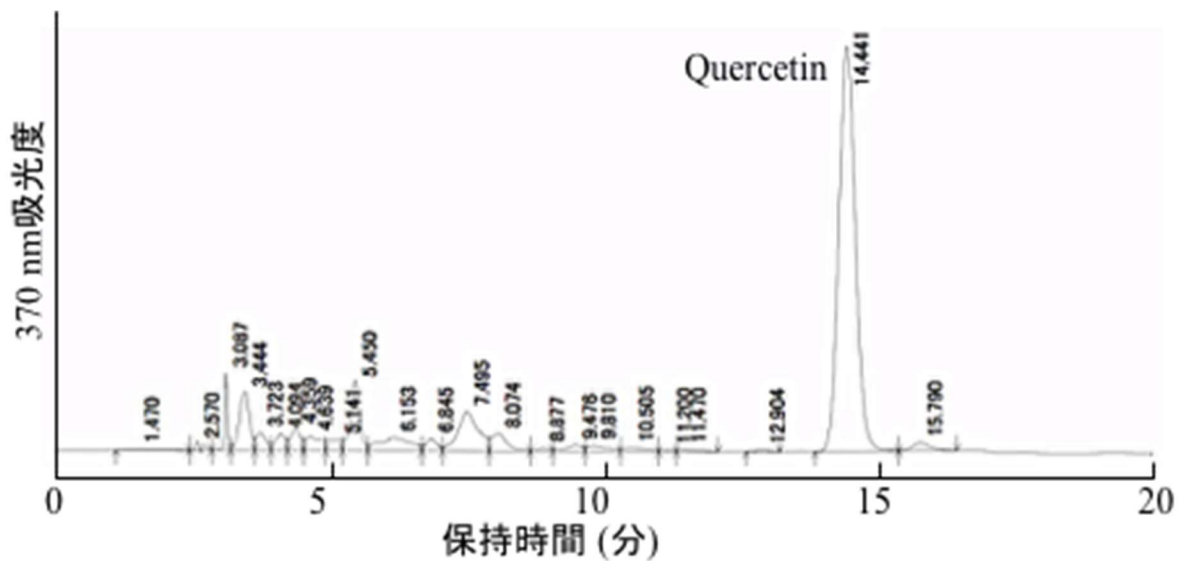


図1 典型的なクロマトグラム

【プロトコール】

1. タマネギ凍結乾燥粉末の調製

- タマネギ可食部を必要に応じて縮分し、重量を測定した後、液体窒素で凍結させる。
- 凍結乾燥する。新鮮重量あたりのケルセチン含有量を算出したい場合は、乾燥後の重量を測定して含水量 (%) を求める。
- 粉碎機を用いて粉末化し、測定まで冷凍保存する。

2. タマネギ凍結乾燥粉末からのケルセチンの抽出および加水分解

- タマネギ凍結乾燥粉末 200 mg (± 5.0 mg) を 30 mL の透明ガラスセラムバイアルに量り取る。
- 希釈液 12 mL を加え、テフロンセプタムとアルミクリンピックで蓋をする。
- ボルテックスミキサーで混合した後、5 分間超音波処理する。
- 90 ± 2 °C となるように設定した実験室オーブン中（庫内温度を温度計で確認すること）で 60 ± 3 分間加熱して加水分解する。
- 15 分程度ごとに容器を振り混ぜて混合する。
- 室温に冷まし、内容物を 25 mL あるいは 20 mL 全量フラスコに移す。バイアルの洗液も全量フラスコに移す。
- メタノールで定容し、転倒混和する。
- 一部をフィルターろ過 ($0.45 \mu\text{m}$ PDVF) し、オートサンプラー用バイアルに入れる。

3. 抽出液中のケルセチンの定量

- HPLC を移動相で最低 30 分間平衡化する。
- 標準液 No. 3 を連続して 6 回注入する。さらに、希釈液を 6 回の分析の終了後に注入し、キャリアオーバーと妨害ピークが観察されないことを確認する。6 回の

分析の標準物質の保持時間とピーク面積の相対標準偏差（RSD）が 1.5 %以下であることを確認する。

- 新たに調製した 5 点の濃度の標準液から検量線を作成する。標準液の分析は、サンプル分析の前、中間付近（おおよそ 12 試料の分析後）、およびサンプル分析の後に行う。検量線のピーク面積と濃度の相関を解析し（原点を必ず通過するような設定としない）、相関係数（ R^2 ）が 0.999 以上であることを確認する。
- シーケンス分析例は以下の通りである。 システム安定性、希釈液ブランク、標準液、希釈液ブランク、試料溶液（1～12）、希釈液ブランク、標準液、希釈液ブランク、試料溶液（13～24）、希釈液ブランク、標準液、希釈液ブランク

【プロトコールのポイント・注意点】

1. タマネギ凍結乾燥粉末からのケルセチンの抽出および加水分解

ケルセチンに由来するピークよりもリテンションタイムが短い大きなピークがクロマトグラム上に観察された場合は、加水分解が十分でない可能性が高い。この際は、以下の 2 点について特に確認する必要がある。

- 1) 保存期間が長く、タマネギ凍結乾燥粉末中に固まりが見られるサンプルを用いる際は、特にボルテックスと超音波処理による分散化を慎重に行う。
- 2) 抽出・加水分解を行う際に用いるオーブンの温度は、温度計で測定する。

2. 計算

試料溶液中のケルセチンアグリコン換算濃度は、370 nm で検出したケルセチンのピーク面積から検量線を用いて計算する。タマネギ試料中に含まれるケルセチンのアグリコン換算量を（式 1）を用いて求める。

$$\text{ケルセチン含有量 } (\mu\text{mol/g 乾燥重量}) = F \times C \div W \quad (\text{式 1})$$

ただし、 C = 検量線から求めたアグリコン濃度 ($\mu\text{mol/L}$)、 W = 試料重量 (g)、また試料溶液を 20 mL に定容した場合の F は 0.02、25 mL に定容した場合の F は 0.025 とする

3. 内部品質管理

イチョウ葉認証標準物質（NIST SRM 3246 *Ginkgo biloba* (leaves)）を用いて内部品質管理が可能である。また、タマネギ凍結乾燥粉末を調製し、均質性を確認した後内部品質管理用の試料として用いることができる。

【おわりに】

本プロトコールは、AOAC 法をタマネギの分析用に改変したものであり、ケルセチンを始めとするフラボノール配糖体を網羅的にアグリコンに分解し、HPLC により定量する。したがって、ケルセチン含有量はアグリコン換算量となる点に注意が必要である。

本実験プロトコールは、農林水産省委託プロジェクト「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」の助成による成果の一部である。

【参考文献】

- 1) P. Brat, S. Georgé, A. Bellamy, L. Du Chaffaut, A. Scalbert, L. Mennen, N. Arnault, MJ, and Amiot, Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables, *J. Nutr.* **136**, 2368-2373 (2006).
- 2) P. Bonaccorsi, C. Caristi, C. Gargiulli, and U. Leuzzi, Flavonol glucoside profile of southern Italian red onion (*Allium cepa* L.), *J Agric. Food Chem.*, **53**, 2733-2740 (2005).
- 3) PM, Aron, and JA, Kennedy, Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity, *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 79-104 (2008).
- 4) K. Murota, and J. Terao, Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, **417**, 12-17 (2003).
- 5) 渡辺純, 室崇人, 柳田大介, 山岸喬, 石川(高野)祐子, 北海道産タマネギ品種のケルセチン含有量と抗酸化能の差異, 日本食品科学工学会誌, **60**, 563-566 (2013).
- 6) J. Watanabe, J. Takebayashi, Y. Takano-Ishikawa, and A. Yasui., Evaluation of a method to quantify quercetin aglycone in onion (*Allium cepa*) by single- and multi-laboratory validation studies. *Analytical Sciences*, **28**, 1179-1182 (2012).