

## 2) ソバスプラウトのフラボノイド・アントシアニンの分析

(独) 農研機構 東北農業研究センター 渡辺 満

### はじめに

ブロッコリーやマスタードをはじめ、多くのスプラウトが利用されるようになった。農薬を使わないで栽培できる安全面でのメリットや、ビタミン等の栄養成分が豊富なことが大きな要因である。それに加えブロッコリースプラウトに豊富に含まれるスルフォラファンのように、スプラウトを特徴づける機能性成分の存在も魅力となっている。

ソバの場合、粉あるいは粒食で利用される種実にはルチン、カテキン等のポリフェノール化合物が含まれている。これに対して植物体のポリフェノールは種実と著しく異なっている。すなわち、ルチンの豊富なことが知られている若葉に加え、芽生え(幼植物)には種実と比較して格段に豊富なルチン、及び 4 種類の C-グリコシルフラボン化合物(オリエンチン、イソオリエンチン、ビテキシン、イソビテキシン)(図 1)が含まれることが、新たに明らかになった<sup>1)</sup>。さらに、軟化栽培(遮光して徒長させる)によりスプラウト(写真)として栽培することで、フラボノイド量は増加し光照射により胚軸のアントシアニン含量も急速に増えることから、彩り鮮やかな食材となる<sup>2)</sup>。

本項では、ソバスプラウトの抗酸化性を有する色素成分として重要なフラボノイドすなわちフラボン・フラボノール(黄色色素)及びアントシアニン(赤色色素)化合物の測定法を紹介する。

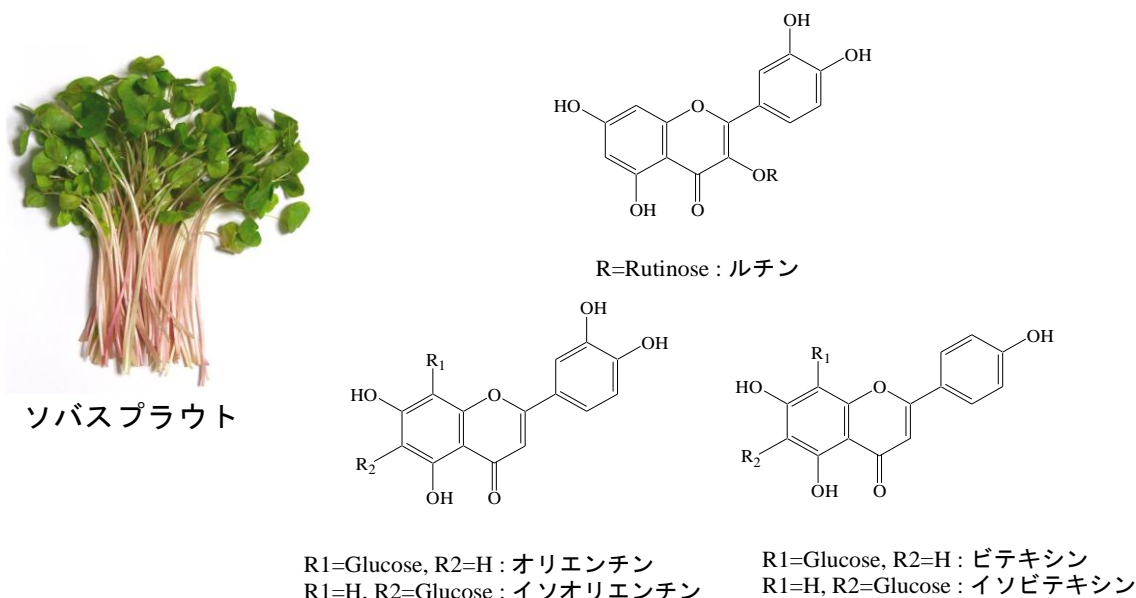


図 1 ソバスプラウトに含まれるフラボノイド化合物

## フラボノイド分析

スプラウトに含まれる 5 種類のフラボノイド化合物は、UV/VIS (紫外可視吸光度) 検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) による分析が可能である。いずれの化合物もスタンダードが市販されていることから、これを使用しての同定、及び検量線を作成することによる定量が可能である。HPLC は逆相・酸性条件下で水-メタノール、あるいは水-アセトニトリル系の溶出溶媒を使用し、溶媒濃度の直線的増加により溶出させるグラジエント法 (濃度勾配溶離法) で分離が可能である。以下は、筆者らが通常使用している条件である。

### 準備するもの

#### 1. 実験器具

- ・抽出時に使用するガラス器具：ナスフラスコ、冷却器等
- ・ディスポーザブルシリンジ

#### 2. 試薬等

- ・HPLC 用溶媒：水、メタノール、酢酸
- ・試料微粒子除去フィルター：親水性ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) シリンジフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ )
- ・フラボノイド標準品：ルチン、イソオリエンチン、オリエンチン、ビテキシン、イソビテキシン (HPLC 分析に適したものを使用)

#### 3. 装置

- ・凍結乾燥装置
- ・粉碎装置
- ・ウォーターバス
- ・ロータリーエバポレーター
- ・HPLC

ポンプ：グラジエント溶出可能なもの

検出器：UV/VIS 検出器

カラムオープン (室温でも分析可能であるが、使用により再現性が向上)

カラム：ODS (4.6×250 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ )

### プロトコール

#### 1. 試料の乾燥・粉碎

スプラウトは適当な大きさに裁断し、凍結乾燥機で十分乾燥する。乾燥物は一部を取り水分測定するとともに、残りを粉碎装置で微粉末にする。

## 2. 抽出

冷却器を付けたナスフラスコにスプラウト粉碎物及びメタノールを加え、ウォーターバスにつけ 80℃、60 分加熱抽出を行う。抽出液は、ろ過あるいは遠心処理による上澄みを採取し、必要によりロータリーエバポレーターで濃縮する。ディスポーザブルシリンジの先にフィルター (PTFE, 0.45 μm) を付け、これを通したものを HPLC 分析用試料液とする。

## 3. HPLC 分析

HPLC は以下の条件に設定する

- ・ 溶離液 A, 5%メタノール (2.5% 酢酸含む)  
B, 95%メタノール (2.5% 酢酸含む)

- ・ グラジエント A : B = 100 : 0 → 20 : 80

60 分

(この後洗浄、続けて分析する場合は平衡化)

- ・ 流速 : 1 mL/min
- ・ UV/VIS 検出器 : 350 nm
- ・ カラムオープン温度 : 40℃

## HPLC クロマトグラム

スプラウト抽出物の典型的なクロマトグラムは図 2 のとおりである。なお、子葉 (双葉) と胚軸 (茎) に分割して抽出・分析した場合、子葉では 5 種類全てのフラボノイドのピークが認められるが、胚軸ではルチンが主要なフラボノイドであり、その他の C-グルコシルフラボン化合物の含量は少ないことから、化合物によってはほとんど検出されない場合もある。

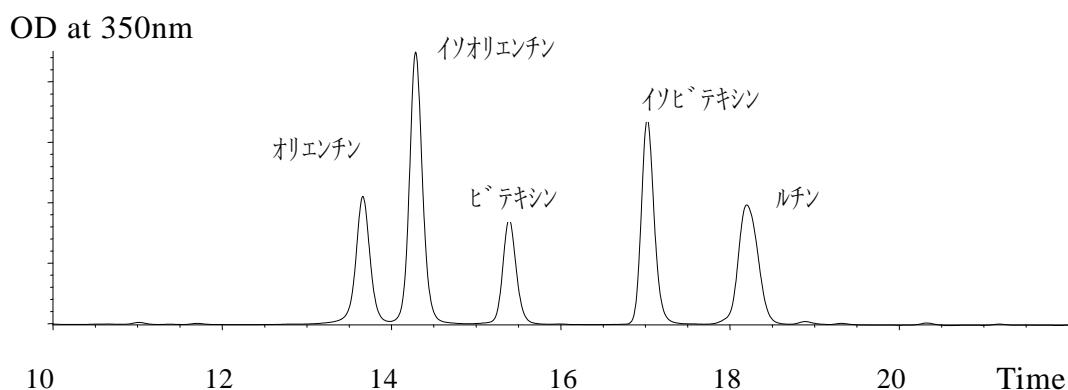


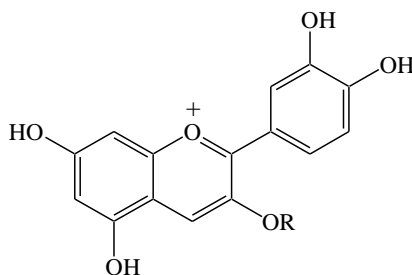
図 2 ソバスプラウト抽出物の HPLC クロマトグラム (350nm)

## 計算

各化合物について種々の濃度のスタンダード溶液を用いて検量線を作成し、定量する。測定した水分量から、乾物重量あたりの測定値を求める。

## アントシアニン分析

ソバスプラウトに含まれるアントシアニンの大部分は、シアニジン 3-ルチノシド(図 3)である<sup>3)</sup>。また植物体(葉)にはシアニジン 3-グルコシドが含まれるとの報告がある<sup>4)</sup>。これら化合物はスタンダードが市販されているため、これを使用し UV-VIS 検出器を接続した HPLC のクロマトグラムを比較することにより、同定及び定量が可能である。また、スタンダードの市販されていないアントシアニンやフラボノイドの推定には、質量分析法(MS)を組み合わせた LC-MS 分析、特に LC-MS/MS 測定が非常に有効な手法として利用されるようになってきた。そこで、ソバスプラウトに含まれるシアニジン 3-ルチノシドを例として紹介する。



シアニジン 3-ルチノシド R=Rutinose (Glc-Rha)  
シアニジン 3-グルコシド R=Glucose

図 3 ソバスプラウトの主要アントシアニンであるシアニジン 3-ルチノシドと葉に含まれるシアニジン 3-グルコシド

## 準備するもの

### 1. 実験器具

- ・抽出時に使用するガラス器具

### 2. 試薬等

- ・Sep-Pak C18 (固相抽出カラム)
- ・HPLC 用溶媒：水，アセトニトリル，トリフルオロ酢酸 (TFA)
- ・アントシアニン標準品：シアニジン 3-ルチノシド (HPLC 分析に適したものを使用)，必要があればシアニジン 3-グルコシド。

### 3. 装置

- ・凍結乾燥装置
- ・粉碎装置

- ・ロータリーエバポレーター

- ・ HPLC

フラボノイド分析と同様の装置，カラムを使用．検出器は UV/VIS（紫外－可視光）を使用する．

## プロトコール

1．試料の乾燥・粉碎：フラボノイド分析と同様に実施

2．抽出

5%ギ酸あるいは 3%TFA 等を粉碎物に添加し，4℃で一晩静置して抽出した後，ろ過あるいは遠心分離により上澄みを採取する．アントシアニンの抽出溶媒として 1%塩酸－メタノール液も多用されるが，アントシアニンによっては，脱アシル化やメチル化を起こす場合があることに注意が必要である．また，メタノールが含まれることにより精製時に固相抽出カラムに保持されないことから，40℃以下でエバポレーターによりメタノールを留去し TFA 等に溶解してから精製する必要がある．

3．精製：固相抽出にて行う．操作は以下のとおり．

- 1) Sep-Pak C18 をメタノール 5 mL で洗浄，続いて 0.1% TFA 5 mL で洗浄（コンディショニング）
- 2) アントシアニン抽出物を添加
- 3) 0.1% TFA 5 mL で洗浄
- 4) 0.1% TFA：エタノール＝2：8 5 mL で溶出
- 5) ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し，少量の 0.1% TFA（またはギ酸）に溶解

4．HPLC 分析

HPLC は以下の条件に設定する

- ・ 溶離液 A， 5% アセトニトリル（0.1% TFA 含む）  
B， 95% アセトニトリル（0.1% TFA 含む）
- ・ グラジエント A：B＝100：0 → 40：60， 40 分  
（この後洗浄、続けて分析する場合は平衡化）
- ・ 流速： 1 mL/min
- ・ UV/VIS 検出器： 520 nm
- ・ カラムオープン温度： 40℃

## HPLC クロマトグラム

スプラウト抽出物の典型的なアントシアニン分析のクロマトグラムは図 4 のと

おりであり、アントシアニンにはシアニジン 3-ルチノシドが大部分を占める。

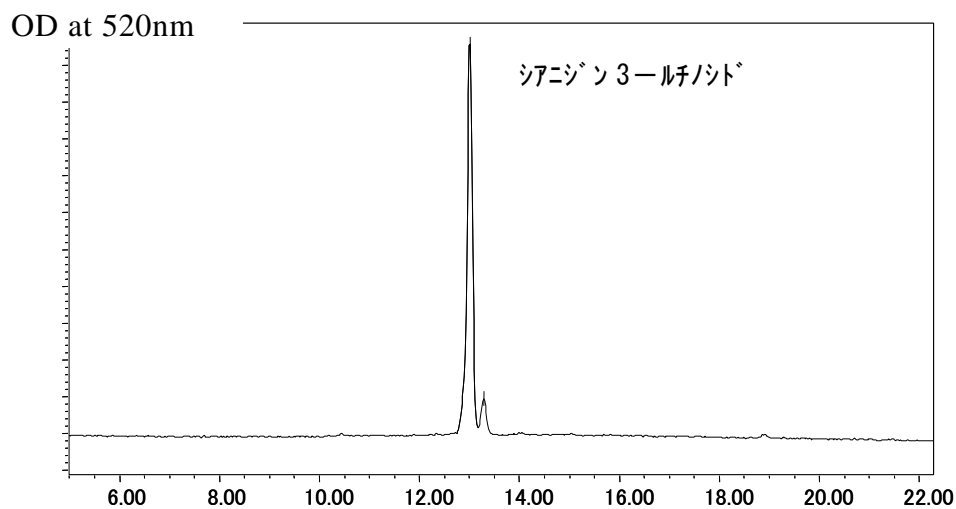


図 4 ソバスプラウト抽出物の HPLC クロマトグラム (520 nm)

## 計算

種々の濃度のスタンダード溶液を用いて検量線を作成し、定量する。測定した水分量から、乾物重量あたりの測定値を求める。

## LC-MS/MS 分析

アントシアニンやフラボノイド分析において、LC-MS/MS はアグリコンや糖の推定に極めて有用な装置である。MS/MS 測定はタンデム四重極型、ハイブリッド型の MS/MS 装置、あるいはイオントラップ型の MS 装置などにより測定が可能であり、それぞれに特徴がある。イオン化は最もソフトなイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法や、低・中極性化合物の分析に適した大気圧化学イオン化 (APCI) 法が使用される。

ソバスプラウトで同定された、シアニジン 3-ルチノシドの MS/MS スペクトル (APCI, ポジティブイオンモード) を図 5 に示す。1 つ目の MS で生じた  $m/z$  595 のシアニジン 3-ルチノシドの親イオンである分子イオン ( $M$ )<sup>+</sup> を、さらに衝突室で不活性ガス (窒素) と衝突解離させることで、2 つ目の MS でルチノシルユニット (Glc-Rha) が脱離したアグリコン ( $m/z$  287) 及びラムノシルユニット (Rha) が脱離したフラグメントイオン ( $m/z$  449) が検出されている。なお、ESI 法でも同様の結果が得られている。

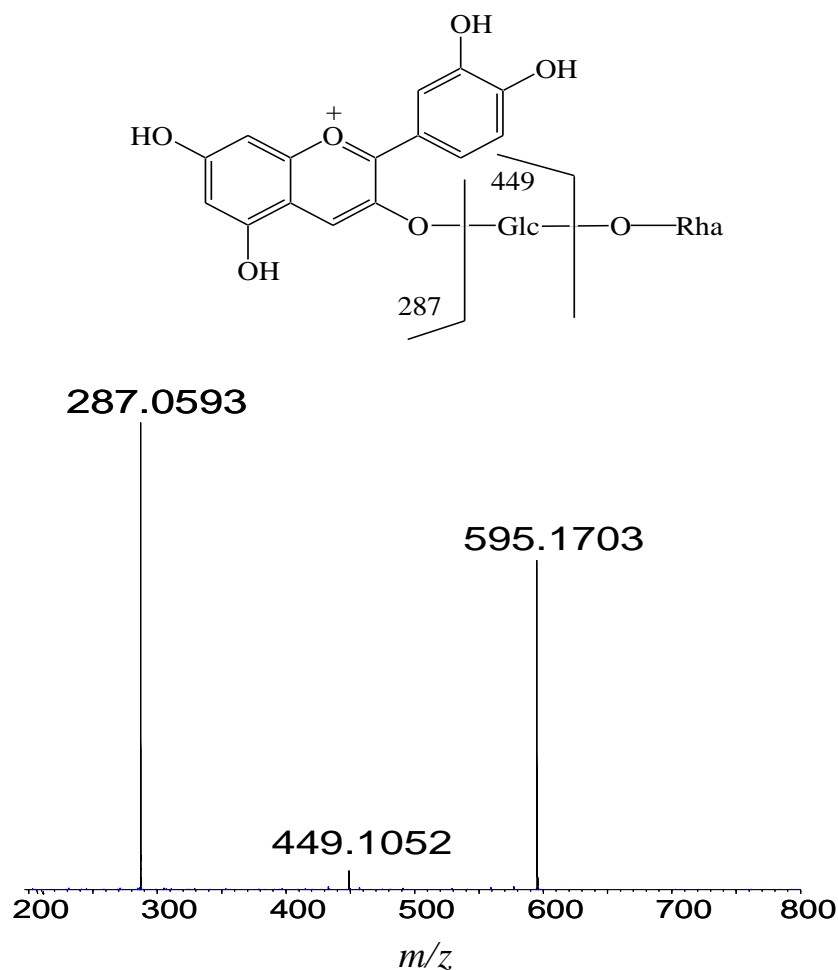


図5 ソバsproutシアニン3-ルチノシド ( $m/z$  595(M)<sup>+</sup>) の正イオン MS/MS スペクトル

ハイブリッド型(四重極-飛行時間型)の LC-MS/MS 装置で測定.

#### 参考文献

- 1) 渡辺満, 伊藤美雪, ソバ植物体のフラボノイド組成の変動, 食科工, **49**, 119-125 (2002).
- 2) 渡辺満, 伊藤美雪, ソバ芽生えのフェノール性化合物量に及ぼす光の影響, 食科工, **50**, 32-34 (2003).
- 3) Watanabe, M., An anthocyanin compound in buckwheat sprouts and its contribution to antioxidant capacity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **49**, 579-582 (2007).
- 4) 加藤信行, 草本植物の紅葉におけるアントシアニンの定性とその分布, 新潟県生物教育研究会誌, **17**, 1-6 (1982).