

カンキツのフラボノイド類（フラバノン、フラボン）測定法

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
西日本農業研究センター 野方 洋一

【はじめに】

カンキツ類はフラボノイドとして、フラバノン、フラボン、フラボノールなどを含む。このうちフラバノンは主要な成分であり、フラボンやフラボノールは植物界に普遍的に存在する。カンキツ果実中では、フラバノン、フラボン、およびフラボノールは配糖体としてアルベド（果皮内側の白い部位）に多く分布し、ポリメトキシフラボンは果皮外側のフラベドに大部分が存在することが知られている。カンキツ果実の最も一般的な加工法は搾汁であるが、搾汁方式により、果汁の酸度や精油成分に加えて、フラボノイドをはじめとした果皮中の機能性成分が果汁中に移行する量も異なってくる¹⁾。従って、生理機能性で多数の研究蓄積のあるフラボノイドの含量や組成を把握することは、青果や加工品の品質、並びに付加価値の評価に有用であると考えられる。

フラボノイドの分析は、一般的に HPLC を用い、構造の違いによる保持時間の相違に基づいて分離し（定性分析）、標準品の検量線とサンプルの UV 吸収値の比率から濃度を決定する（定量分析）。加えて、フラボノイドでは 2 個のベンゼン環を連結する 3 個の炭素原子の状態が UV 吸収スペクトルに反映されることも定性の手掛かりになる²⁾。例えば、フラバノンの吸収極大波長は 275-295 nm、フラボンは 315-350 nm、フラボノールは 350-385 nm であり、標準品とサンプルピークの UV 吸収スペクトル曲線の比較により、基本骨格、およびある程度のアグリコンの構造推定は可能である。

本稿では、品種・系統間で多様なフラボノイド組成が知られているカンキツ果実のフラバノン配糖体、フラボン配糖体、およびポリメトキシフラボンを中心に、カンキツのフラボノイドの測定法を紹介する。

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- ・遠心分離機
- ・凍結乾燥機
- ・粉砕装置：遠心粉砕機など
- ・ホモジナイザー：ポリトロンなど
- ・ロータリーエバポレーターまたは遠心エバポレーター
- ・高速液体クロマトグラフ（HPLC）装置：送液ポンプ（2液グラジエント送液が可能な構成）、デガッサー、カラムオーブン、オートサンプラー（必要に応じて）、フォトダイオードアレイまたは UV 検出器、データ解析装置
- ・HPLC カラム：ODS カラム（4.6×250 mm、粒子径 5 μm）

2. 試薬

1) 溶媒

- ・メタノール（特級）
- ・ジメチルスルホキシド（特級）
- ・超純水

2) HPLC 分析用溶媒

- ・メタノール (HPLC 用)
- ・アセトニトリル (HPLC 用)
- ・リン酸 (特級)

3) 標準品

- ・主要なものは試薬メーカーから市販されている。純度が規定されている HPLC 分析用試薬を用いる。

3. 消耗品

1) 試料前処理用固層抽出カートリッジ

- ・ YMC Dispo SPE ODS (500 mg、3 ml、YMC 社)、Strata C₁₈ (500 mg、3 ml、Phenomenex 社)、Sep-Pak Plus C₁₈ (360 mg、Waters 社) など。必要に応じて、目的成分を検出、測定に適した濃度に濃縮し、マトリックス成分による妨害をなくすために使用する。

2) ディスポーザブルシリンジ (1~2 ml)

3) HPLC サンプル前処理用メンブレンフィルター

- ・ PTFE など有機溶媒耐性タイプ (0.5 μm 以下)

【プロトコール】

1. 分析試料の調製

1) 試料

- ・ 果皮 (フラベド、アルベド)、じょうのう、じょうのう膜、砂じょう、葉など、目的の部位に切り分け、秤量後、凍結保存する。

2) 凍結乾燥試料

- ・ 果皮 (フラベド、アルベド)、じょうのう膜、葉などの部位は凍結乾燥し、遠心粉砕機などにより破砕後、デシケーター中に密封して凍結保存する。
- ・ サンプルを室温に戻し、100-150 mg を蓋付き試験管に取り、適量の抽出溶媒 [メタノール:DMSO、(1:1)] を加え、室温で 30 分間程度超音波処理する。その後、3,000 g で 10 分間遠心し、上清を回収する。沈殿に適量の抽出溶媒を加え、同様に遠心分離し、上清を回収する操作を数回繰り返す、5.0-10.0 ml に定容し、抽出液とする。

3) 砂じょう、じょうのう試料

砂じょうまたはじょうのうを 10-20 g 計り取り、ホモジナイザーで破砕後、15,000 g で 20 分間遠心分離する。上清を回収後、沈殿に回収液の 1/20 溶の抽出溶媒を添加する。沈殿を懸濁後、超音波処理し、3,000 g で 10 分間遠心分離後、上清を回収する操作を 2 回繰り返す、回収液を合わせて抽出液とする。

4) 固相抽出カートリッジによる前処理

- ・ 砂じょうまたはじょうのうの抽出物は、固相抽出カートリッジで濃縮処理する。カートリッジを 5.0 ml のメタノールで活性化し、5.0 ml の 10%メタノールでコンディショニング後、抽出液を添加する。5.0 ml の 10%メタノールで洗浄後、溶出溶媒 [メタノール-DMSO、(1:1)] を通液し、フラボノイドを溶出、回収する。溶出液は 5.0 ml 程度に定容し、HPLC のサンプル液とする。
- ・ 凍結乾燥試料から調製した抽出液は、メンブレンフィルターでろ過後、HPLC 分析するが、夾雑成分を除去したい場合は固相抽出カートリッジ処理しても良い。凍結乾燥試料 100 mg 相当の抽出液を水で 10 倍に希釈し、上記操作を行い、HPLC のサ

ンプル液とする。

2. フラバノン、フラボン配糖体の HPLC 分析

- ・カラム：ODS カラム (4.6×250 mm、粒子径 5 μm)、Lichrospher 100 RP-C₁₈ (アジレント・テクノロジー社)、YMC-Pac ODS-AM (YMC 社) など
- ・カラム温度：40℃
- ・グラジエント条件：A 液 (10 mM リン酸)、B 液 (メタノール)。

ステップ 1: 0-55 分:70-55% A、ステップ 2: 55-95 分:55-0% A、ステップ 3: 95-100 分:0% A

溶出成分は、保持時間と 200-360 nm の UV 吸収スペクトル曲線をスタンダードと比較することにより同定する。固定波長の場合は、保持時間との比較により同定する。成分の定量は、スタンダードのピーク面積値との比率により計算する。

- ・移動相流速：0.6 ml/min
- ・検出波長：フォトダイオードアレイ：200-360 nm、またはフラバノン：285 nm、フラボン：330 nm
- ・注入量：10 μl
- ・サンプル液は、メンブレンフィルターでろ過後、HPLC 分析する。

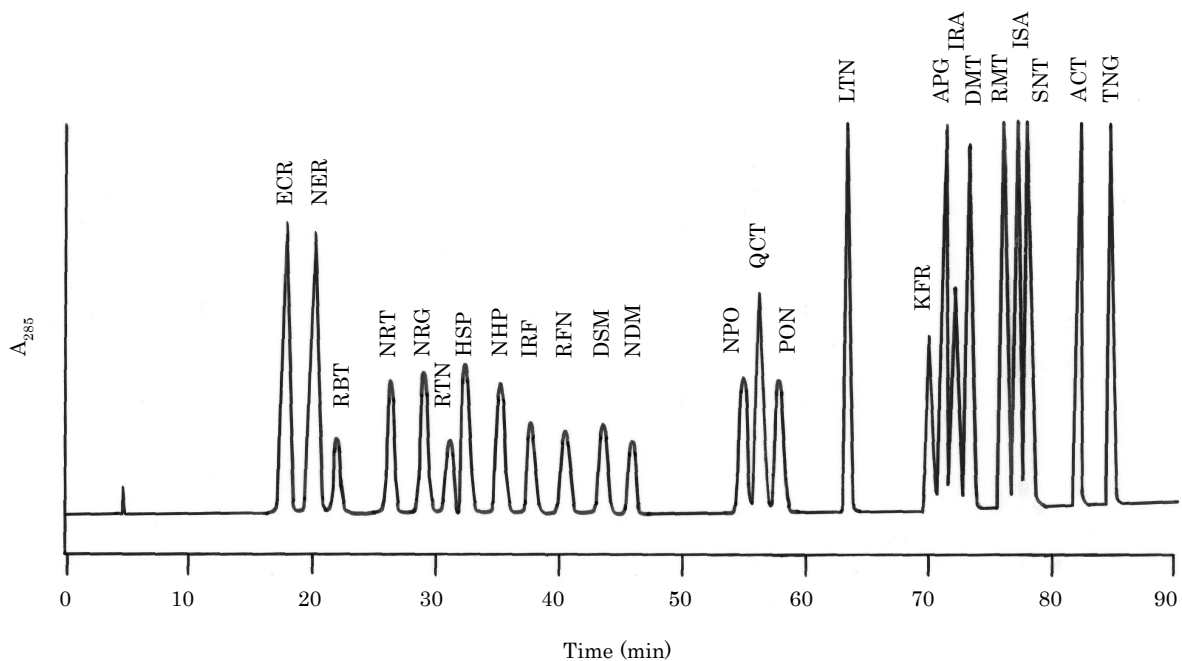


図1 標準試料の HPLC クロマトグラム。

ECR, エリオシトリン; NER, ネオエリオシトリン; RBT, ロビネチン; NRT, ナリルチン; NRG, ナリンジン; RTN, ルチン; HSP, ヘスペリジン; NHP, ネオヘスペリジン; IRF, イソロイフォリン; RFN, ロイフォリン; DSM, ディオスミン; NDM, ネオディオスミン; NPO, ネオポンシリン; QCT, ケルセチン; PON, ポンシリン; LTN, ルテオリン; KFR, ケンフェロール; APG, アピゲニン; IRA, イソラムネチン; DMT, デイオスメチン; RMT, ラムネチン; ISA, イソサクラネチン; SNT, シネンセチン; ACT, アカセチン; TNG, タンジェレチン。分析カラムは、ガードカラム付属の Lichrospher 100 RP-C₁₈ (4.6×250 mm、粒子径 5 μm) を使用した。

【プロトコールのポイント・注意点】

1. 分析試料の調製

- ・凍結乾燥試料の粉碎物は、140 メッシュ (目開き 106 μm) 以上の粉体が望ましいが、粒径が大きい場合、抽出系をスケールアップしてホモジナイザーで破碎するなど、抽出条件を検討する必要がある。
- ・果皮 (フラベド、アルベド)、じょうのう膜、葉などの部位を生試料から抽出する場合には、試料重に対する抽出溶媒の容量として、定容量が 10 倍程度にする。カッターなどで細切後、抽出溶媒を加えてホモジナイザーで破碎し、遠心分離と回収を繰り返しし、定容する。
- ・HPLC 用分析サンプルは、 -20°C の保存で 1 カ月程度は安定である。

表 1 標準試料の HPLC パラメーター. 保持時間 (t_R)、保持比 (k')、相対保持値 (\cdot)、および UV 吸収極大波長 (\cdot_{max}).

略称	骨格	$t_R \pm \text{S.D.}^a$	k'	α	λ_{max}
ECR	フラバノン	17.59 \pm 0.05	2.84		285
NER	フラバノン	19.85 \pm 0.05	3.33	1.17	285
RBT	フラボノール	21.81 \pm 0.07	3.76	1.13	251, 318
NRT	フラバノン	25.97 \pm 0.07	4.67	1.24	282
NRG	フラバノン	28.81 \pm 0.07	5.29	1.13	284
RTN	フラボノール	30.81 \pm 0.07	5.73	1.08	258, 360
HSP	フラバノン	32.09 \pm 0.08	6.01	1.05	285
NHP	フラバノン	34.95 \pm 0.08	6.63	1.10	284
IRF	フラボン	37.33 \pm 0.08	7.15	1.08	267, 336
RFN	フラボン	40.27 \pm 0.08	7.79	1.09	268, 336
DSM	フラボン	43.17 \pm 0.07	8.43	1.08	253, 268, 345
NDM	フラボン	46.11 \pm 0.06	9.07	1.08	255, 268, 345
NPO	フラボン	54.64 \pm 0.06	10.93	1.21	284
QCT	フラボノール	56.32 \pm 0.10	11.30	1.03	256
PON	フラボン	57.65 \pm 0.06	11.59	1.03	284
LTN	フラボン	62.93 \pm 0.06	12.74	1.10	242, 256, 351
KFR	フラボノール	70.02 \pm 0.02	14.29	1.12	253, 266
APG	フラボン	71.55 \pm 0.06	14.62	1.02	269, 335
IRA	フラボノール	72.01 \pm 0.08	14.72	1.01	253
DMT	フラボン	73.25 \pm 0.04	14.99	1.02	252, 268, 347
RMT	フラボノール	76.51 \pm 0.03	15.71	1.05	256
ISA	フラボン	77.28 \pm 0.05	15.87	1.01	282
SNT	フラボン	77.84 \pm 0.06	16.00	1.01	240, 265, 326
ACT	フラボン	82.19 \pm 0.04	16.95	1.06	269, 301, 329
TNG	フラボン	84.88 \pm 0.04	17.53	1.03	271, 322

^a 5 回測定値の標準偏差. 分析カラムは、ガードカラム付属の Lichrospher 100 RP-C₁₈ (4.6 \times 250 mm、粒子径 5 μm) を使用した.

2. フラバノン、フラボン配糖体の HPLC 分析

- ・使用する ODS カラムによりフラボノイドの溶出位置は異なる。また、カラムの累計使用時間によっても溶出位置は変動するので、定期的に標準品の溶出位置を確認する必要がある。

- ・表 1 に示す λ_{\max} 値は、溶出溶媒の組成により変化する。
- ・図 1 および表 1 に示すデータは送液ポンプ 2 台を用いた高圧グラジエント方式で得られたものであり、ポンプ 1 台を用いる低圧方式で分析する場合は、若干のグラジエント遅れが発生する。
- ・一波長での検出は 285 nm に設定するが、フラボン類が主体の分析の場合は 330 nm で検出する。
- ・本条件は、フラバノンおよびフラボン配糖体の分離に主眼を置いており、これらはおよそ 60 分以内に溶出する。それ以降に溶出するアグリコン類やポリメトキシフラボノイド類の溶出時間は近接する。疎水性の高いフラボノイドの分析が目的の場合、後述するポリメトキシフラボンの HPLC 分析条件を参考にする。

【プロトコール】

1. ポリメトキシフラボンの HPLC 分析

- ・分析試料の調製は前述のプロトコールに従う。
- ・カラム：フラバノン、フラボン配糖体の HPLC 分析と同じ
- ・カラム温度：40°C
- ・グラジエント条件：A 液（水）、B 液（アセトニトリル）
- ステップ 1: 0-10 分:50-45% A、ステップ 2: 10-13 分:45-15% A、ステップ 3: 13-15 分 15% A
- ・移動相流速：0.9 ml/min
- ・検出波長：フォトダイオードアレイ：200-360 nm または 330 nm
- ・注入量：10 μ l

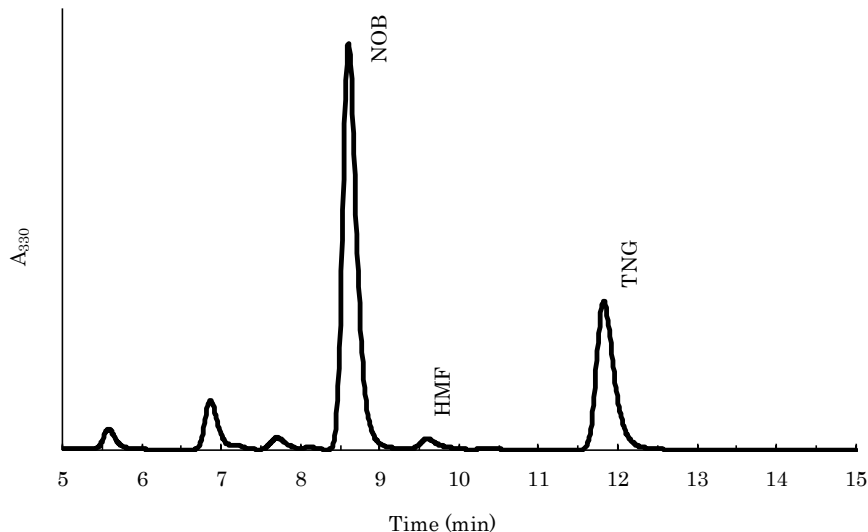


図 2 シークワサー果皮乾燥物の HPLC クロマトグラム。

NOB, ノビレチン; HMF, ヘキサメトキシフラボン; TNG, タンジェレチン. 分析カラムは、ガードカラム付属の Lichrospher 100 RP-C₁₈ (4.6×250 mm、粒子径 5 μ m) を使用した。

【プロトコールのポイント・注意点】

1. ポリメトキシフラボンの HPLC 分析
 - ・グラジエント条件は、ノビレチンおよびタンジェレチンなど、主要な成分の分析に設定している。複雑なフラボノイド組成をもつサンプルの分析には、グラジエント条件を変更する必要がある。水-アセトニトリル溶離液系では、グラジエント条件の調整で、ヘスペリジン、ノビレチン、ヘキサメトキシフラボン、およびタンジェレチンの同時分析が可能である³⁾。

【おわりに】

これまでの研究蓄積から、カンキツ果実の主要な品種・系統のフラボノイド組成については、ある程度明らかになっている。田中はカンキツ属を初生カンキツ亜属と後生カンキツ亜属とに二大別し、28の分類区とこれに属する159種に分類番号を付する方式を提唱した⁴⁾。田中の分類と報告されたフラボノイド組成を照合すると、アルベドのフラボノイド組成から、分類区の推定は可能と考えられた^{5, 6)}。最近、タンカン、ジャバラ、ゆうこう、ユコウなど、地域に特色のあるカンキツが注目され、青果や加工品が地域特産品として開発されている。これらのフラボノイド組成について分析データが蓄積されつつあり⁷⁾、果実の機能性評価の手掛かりになることが考えられる。

【参考文献】

- 1) Nogata, Y., Ohta, H., Sumida, T. and Sekiya, K., Effect of extraction method on the concentrations of selected bioactive compounds in mandarin juice. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7346-7351 (2003).
- 2) Nogata, Y., Ohta, H., Yoza, K., Berhow, M. and Hasegawa, S., High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in *Citrus* with a photodiode array detector. *J. Chromatogr. A*, **667**, 59-66 (1994).
- 3) Zheng, G.D., Yang, D.P., Wang, D.M., Zhou, F., Yang, X. and Jiang, L., Simultaneous determination of five bioactive flavonoids in pericarpium *Citri Reticulatae* from China by high-performance liquid chromatography with dual wavelength detection. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6552-6557 (2009).
- 4) Tanaka, T., Misunderstanding with regards citrus classification and nomenclature. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture Series B Agriculture and Biology*, **21**, 139-145 (1946).
- 5) Nogata, Y., Sakamoto, T., Shratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M. and Ohta, H., Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 178-192 (2006).
- 6) 野方洋一、太田英明、食品鑑定技術ハンドブック (サイエンスフォーラム、東京)、第5節 生鮮果実の品種判別 I カンキツ類、118-124 (2005)。
- 7) 三宅義明、国内地域特産の香酸カンキツ果実に含まれるフラボノイドの特徴、日本食生活学会誌, **26**, 71-78 (2015)。