

# 植物性食品素材からのフラボノイド成分の酸加水分解条件と 抽出条件の設定

1) 吉元 あや美 2) 武曾 歩 1) 山本 健太 3) 船越 淳子 1) 太田 英明

## Optimization of Acid Hydrolysis and Extraction Conditions of Flavonoid Components in Plant Food Materials

Ayami Yoshimoto Ayumi Musou Kenta Yamamoto Atsuko Funakoshi Hideaki Ohta

(2020年11月25日受理)

### 緒言

フラボノイドは植物界に広く分布し<sup>1),2)</sup>、A環、B環およびヘテロ環(C環)から構成され、C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>構造をもつ一連の化合物である。狭義には、フラボノイドはフラボン、フラボノール、フラバノン、フラバノール、イソフラボン類とその配糖体を指す。植物性食品素材中では、ほとんどのフラボノイドは配糖体の形で存在しているため、抽出には主としてアルコール類を中心とする有機溶媒が用いられてきた<sup>3)</sup>。

また、ヒトが摂取したフラボノイドの大部分はその基本骨格であるアグリコンとして吸収されることから<sup>4)</sup>、多様かつ複雑な化学構造をとる個々のフラボノイド成分の定性・定量よりも加水分解したフラボノイドアグリコンを測定する研究の方が植物性食品素材を評価する際には実用性に富むと考えられる。フラボノイド配糖体の加水分解については、フラボノイドの化学構造に関する研究への応用のために、希硫酸、希塩酸による酸加水分解、ならびにグルコシターゼによる酵素的分解に関する研究が行われてきた<sup>5),6),7),8)</sup>。

本研究では、植物性食品素材を対象とするため基質特異性が高く、各種食品成分が阻害的に作用する可能性が高い酵素的分解よりも、一般的に適用可能と思われる酸による加水分解の方が有用であると考えられる。まず、フラボノイド配糖体の加水分解に関して、一般的に最も利用される塩酸を用い、ルチン(ケルセチン-3-ルチノサイド、図1)をモデル化合物にして、生成するケルセチン(図1)量を指標として塩酸濃度、加水分解時間等の最適条件を求めた。次に、実際の測定法への適用を目的として、タマネギの可食部を対象に、従来の報告<sup>3)</sup>に基づき抽出溶媒を検討した。さらにルチンを多量に含有するタマネギ<sup>9)</sup>からのフラボノイド抽出物に関して、ケルセチン生成量が最大となる最適加水分解条件を調査した。

解の方が有用であると考えられる。まず、フラボノイド配糖体の加水分解に関して、一般的に最も利用される塩酸を用い、ルチン(ケルセチン-3-ルチノサイド、図1)をモデル化合物にして、生成するケルセチン(図1)量を指標として塩酸濃度、加水分解時間等の最適条件を求めた。次に、実際の測定法への適用を目的として、タマネギの可食部を対象に、従来の報告<sup>3)</sup>に基づき抽出溶媒を検討した。さらにルチンを多量に含有するタマネギ<sup>9)</sup>からのフラボノイド抽出物に関して、ケルセチン生成量が最大となる最適加水分解条件を調査した。

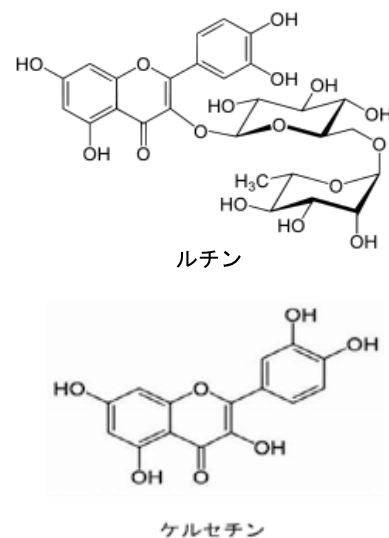


図1 ルチンおよびケルセチン構造式

執筆者紹介: 1)中村学園大学栄養科学部フード・マネジメント学科 2)中村学園大学栄養科学部栄養科学科  
3)西南女学院大学保健福祉学部栄養学科  
別刷請求先: 吉元あや美, 〒814-0198 福岡県福岡市城南区別府 5-7-1 ayoshimoto@nakamura-u.ac.jp

## 実験方法

### 1. 実験材料

福岡県農業試験場で栽培・収穫された札幌黄色系タマネギ10 kgを利用した。剥皮し、芯を除去した可食部を2 mm角に切断した。液体窒素で凍結後、超低温フリーザー (-80°C) に保管し、真空凍結乾燥を行った。真空凍結した試料はミキサーによって粉碎し、-80°Cで保存し分析に供した。

### 2. 試薬

供試したルチン、ケルセチンの標準試薬はExtrasynthese S.A.社製を、移動相として使用したメタノールは和光純薬工業社製のHPLC用特級試薬を、また抽出には和光純薬工業社製の特級試薬を利用した。HPLC分析に供した水は、蒸留水をミリポア社製Mill-Q.Jr.で処理して利用した。HPLC分析以前の粗抽出物の精製には、ウォーターズ社製Sep-Pak C18を使用した。

### 3. 方法

#### 1) モデル化合物 (ルチン) を用いた加水分解条件の検討方法

ルチンを30%ジメチルスルホキシドを含有したメタノールに溶解し、50 mM濃度にした。このルチン溶液を目盛りネジ蓋付きの試験管に2.5 mLずつ注入、最終塩酸濃度が1.2 M、1.6 M、2.0 Mの50%メタノール液となるよう調製し全量を5 mLとした。試験管のヘッドスペース部に窒素ガスを封入後、90°Cの恒温槽で一定時間(0、5、10、20、30、60、90、120分間)加水分解を実施した。加水分解の終了は、氷水中に供試試験管を浸けることによって行った。加水分解物(1 mL)は蒸留水で10倍希釈し、その10 mLを前処理したSep-Pak C18に吸着させた。蒸留水5 mLで2回洗浄後、100%メタノール5 mLで溶出させ、HPLC分析に供した。HPLC装置は島津製作所製LC-10Aを用い、分析条件は、逆相カラム:Lichrospher 100:RP-18(φ4.6×250 mm、5 μm)、カラム温度:40°C、検出波長:360 nm、流速:0.6 mL/分、移動相:A液10 mMリン酸溶液、B液メタノール、B液濃度45~55%(45分間)で行った。

ルチンから加水分解で生ずるケルセチン量は、1 Mのルチンから1 Mのケルセチンが生ずる比率を100%とする生成率で表示した。

#### 2) タマネギ粉末を用いた抽出溶媒条件と加水分解条件の検討方法

真空凍結乾燥タマネギ粉末500 mgを秤量し、50 mL共栓付き遠心管にとり、50 mLの100%メタノールあるいは1.0 M、1.2 M、2.0 M塩酸を含む50%メタノール液を加え、12時間あるいは24時間、室温下で振とうしながら放置後、3000 rpm、10分間遠心分離処理し、沈降物を同抽出液2回で洗浄、遠心分離を繰り返して、上清液を50 mLに定容した。100%メタノールで抽出した上清液はエバポレーター(40°C)で濃縮し、1.0 M、1.2 Mおよび2.0 M塩酸を含む50%メタノール液50 mLで溶解した。加水分解からHPLC分析までは1)と同様に行った。

## 結果および考察

### 1. モデル化合物 (ルチン) を用いた加水分解条件の検討結果

フラボノイド配糖体からそのアグリコンを生成するための最適加水条件を見出すために、モデル化合物のルチンから生成するケルセチン量を指標として、塩酸濃度および加水分解時間等の最適条件を求めた結果を表1に示した。室温下である加熱0分では、ケルセチンの生成は全く観察されなかった。1.2 M塩酸で90°C、10~30分間の酸加水分解を行った試験区において、ケルセチンの生成比率が99.6~106.3%と高い値を示した。また、塩酸濃度が高くなるにつれ、ケルセチン生成量が最大を示す加水分解時間は短くなった。1.2 M塩酸では60分間以降に、1.6 M塩酸では30分以降に、2.0 M塩酸では10分以降に、ケルセチンの生成比率は減少していた。いずれの条件も、生成したケルセチンは加水分解時間の経過とともに減少し、分解されることが示唆された。特に、2.0 M塩酸では5分以降で、ルチンから生成されるケルセチン量が80%以下と低い値を示したため、加水分解条件としては不適であると考えられた。

### 2. タマネギ粉末を用いた抽出溶媒条件と加水分解条件の検討結果

抽出溶媒を100%メタノールとし、前項の検討に基づいて塩酸濃度をより低くした1.0 M、1.2 M、1.6 Mの3濃度で試験区を設定し、植物性食品素材にケルセチン配糖体を高濃度に含むタマネギを選択して<sup>9),10)</sup>、最も多量にケルセチンを生成する加水分解条件を検討した。

タマネギの粉末から100%メタノールで12時間フラボノイド類を抽出し、90°Cで5~120分間酸加水分解した場合のケルセチン生成量

表 1 酸加水分解によって生成したケルセチン量の標準ケルセチンに対する比率 (%)

Time (min)	HCl (M)		
	1.2	1.6	2.0
0	0	0	0
5	87.5 ± 4.5	78.7 ± 3.2	96.3 ± 5.1
10	106.3 ± 3.3	99.2 ± 4.4	75.4 ± 6.0
20	99.6 ± 4.0	97.2 ± 4.4	79.1 ± 2.3
30	105.3 ± 3.6	92.1 ± 2.0	81.9 ± 5.3
60	87.2 ± 6.3	92.1 ± 2.0	71.3 ± 5.8
90	86.5 ± 2.4	83.4 ± 1.3	66.1 ± 5.5
120	89.4 ± 3.6	74.4 ± 4.6	53.4 ± 5.1

平均 ± S.D. (n=4)

表 2 100%メタノールを用いて 12 時間抽出し、酸加水分解した場合のケルセチン生成量 (mg / kg 乾物量)

Time (min)	HCl (M)		
	1.0	1.2	1.6
0	0	0	0
5	869 ± 50	954 ± 69	970 ± 35
10	1229 ± 56	1339 ± 18	1493 ± 22
20	1570 ± 70	1474 ± 102	1125 ± 36
30	1600 ± 69	1451 ± 121	1200 ± 34
60	1503 ± 65	1100 ± 58	652 ± 73
90	1426 ± 68	846 ± 89	436 ± 83
120	1249 ± 130	639 ± 76	338 ± 14

平均 ± S.D. (n=6)

表 3 50%メタノール抽出溶液を用いて 12 時間抽出し、酸加水分解した場合のケルセチン生成量 (mg / kg 乾物量)

Time (min)	HCl (M)		
	1.0	1.2	1.6
0	0	0	0
5	1108 ± 125	1153 ± 78	1178 ± 69
10	1512 ± 39	1647 ± 59	1836 ± 125
20	1933 ± 78	1813 ± 29	1384 ± 99
30	1942 ± 132	1405 ± 140	1380 ± 55
60	1745 ± 79	1808 ± 25	792 ± 140
90	1723 ± 155	996 ± 89	578 ± 110
120	1623 ± 77	772 ± 140	379 ± 144

平均 ± S.D. (n=6)

表 4 50%メタノール抽出溶液を用いて 24 時間抽出し、酸加水分解した場合のケルセチン生成量 (mg / kg 乾物量)

Time (min)	HCl (M)		
	1.0	1.2	1.6
0	0	0	0
5	1263 ± 152	1418 ± 149	1305 ± 96
10	1749 ± 16	2026 ± 116	2269 ± 133
20	2406 ± 169	2350 ± 203	1710 ± 156
30	2390 ± 203	2224 ± 119	1698 ± 211
60	2236 ± 156	1738 ± 96	988 ± 115
90	2129 ± 226	1225 ± 145	711 ± 132
120	1996 ± 220	950 ± 169	446 ± 56

平均 ± S.D. (n=6)

を表2に要約した。用いた加水分解条件の中でケルセチン生成量が最も大きいのは1.0 M塩酸の30分間であり、1600 mg/kg乾物量を示した。これに対して、1.2 M塩酸での加水分解ではケルセチンの最大値が20分間処理の1474 mg、1.6 M塩酸では10分間処理の1493 mgであった。この条件においても、供試塩酸濃度では、室温下である加熱処理前ではケルセチンの生成は全く観察されなかった。

次に、タマネギからのフラボノイドの抽出溶媒をより高極性の50%メタノールを用いて、上記と同じ塩酸濃度、加水分解温度および時間でケルセチン生成量を調査した結果を表3に示した。ケルセチン生成量が最も大きいのは1.0 M塩酸で30分間処理した条件であり、1942 mg/kg乾物量であった。これは100%メタノールと同様の結果であり、同条件の1600 mg/kg乾物量に対して、21%程度高い値を示した。同様に1.2 M塩酸の加水分解も、ケルセチンの最大値が加水分解20分間処理で1813 mg/kg乾物量、1.6 M塩酸では10分間処理で

1836 mg/kg乾物量となり、どちらの抽出溶媒でも100%メタノールを用いた時よりも23%高い値を示す結果となった。これは、水に対してフラボノイド配糖体がより高い溶解性をもつことに起因していると考えられる<sup>3)</sup>。

次に抽出時間を検討するため50%メタノールの条件を用いて抽出時間を12時間から24時間に延長し、同様に酸加水分解した結果を表4に示した。その結果、1.0 M塩酸の20分間加水分解処理で最大のケルセチン生成量となり、12時間抽出の同条件である1933 mg/kg乾物量(表3)より25%高い2406 mg/kg乾物量であった。さらに、100%メタノールで12時間抽出し、1.0 M塩酸、90℃、30分間加熱処理で得られたケルセチン含量(1600 mg/kg乾物量)よりも50%以上高い数値を示す結果となった。

以上より、植物性食品素材のタマネギから最大量のケルセチンを得るには、抽出溶媒をより高極性のある50%メタノールを使用し、24時間抽出を行い、1.0 M塩酸濃度、90℃、20分間の加水分解が最適な条件であると考えられた。

## 要約

フラボノイド配糖体のモデル化合物としてルチン（ケルセチン-3-ルチノサイド（グルコース-ラムノース））を選択し、加水分解で生じたケルセチン含量を指標に塩酸濃度および加水分解時間を検討した結果、1.2 M塩酸、90℃、10分～30分間処理が最も高い条件が得られた。次に、ルチン含量の高いタマネギを材料にケルセチンの最大生成条件を求めた結果、抽出溶媒として50%メタノール、抽出時間24時間（室温下、振とう放置）、90℃、1.0 M塩酸濃度、20分間の加水分解処理で最も高いケルセチン生成量が得られた。

## 文献

- 1) 岩科司:食品に含まれるフラボノイドとその機能(果物のフラボノイド). 食品工業, 37, 52-69 (1994)
- 2) H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa: Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J Agric Food Chem*, 49, 3106-3112 (2003)
- 3) 三井清司:「植物色素、V 色素成分一般」林 孝三編, (養賢堂) pp.93-150 (1980)
- 4) C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Remesy: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81, 230S-242S (2005)
- 5) J. B. Harborne: Plant polyphenols-XIV; Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochemistry*, 4, 107-120 (1965)
- 6) W. Wildanger, K. Herrmann: Qualitativer nachweis und Quantitativebestimmung von flavonolen und flavonen. *J. Chromatogr.*, 76, 433-440 (1973)
- 7) 津志田藤二郎, 鈴木雅博: タマネギに存在するフラボノイド配糖体の分析および化学合成による同定. *日食工誌*, 42, 100-108 (1995)
- 8) W. Koenigs, E. Knorr: Ueber einige derivate des traubenzuckers und der Galactose. *Ber.*, 34, 957 (1901)
- 9) A. Bilyk, P. L. Cooper, G. M. Sapers: Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) Tissue. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 274-276 (1984)
- 10) M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollmann, D. V. Venema: Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1591-1598 (1992)