

平田赤ネギのポリフェノールと食品素材開発

誌名	山形県工業技術センター報告
ISSN	0286813X
著者	菅原, 哲也 石塚, 健 長, 俊広 五十嵐, 喜治
巻/号	42号
掲載ページ	p. 73-77
発行年月	2011年3月

平田赤ネギのポリフェノールと食品素材開発

菅原 哲也 石塚 健 長 俊広 五十嵐 喜治*

Chemical structure and Processing utilization of Polyphenols in HIRATA-Red Welsh onion

Tetuya SUGAWARA Ken ISHIZUKA Toshihiro CHYO Kiharu IGARASHI*

1 緒 言

酒田市特産の在来作物である平田赤ネギは、食味に優れ、特徴的な色合いを有し、東北経済産業局より地域ブランドとして認定されている。現在、赤ネギの出荷量は約 22t であり、栽培面積は年々増加傾向にある。また、赤ネギは出荷量と同程度の大量の規格外産物が発生しているが、生食出荷される以外に、加工用途がないため、ほとんど利用されていない。

そこで、赤ネギの高付加価値化や生食出荷されない赤ネギの有効活用を目的とし、赤ネギに含まれる特徴的な赤色素であるアントシアニンやフラボノイドといったポリフェノール成分の化学構造を解析するとともに、生理活性の構造相関を明らかにした。さらに、赤ネギの廃棄部位を活用し、ポリフェノール含有量の高い食品素材を開発したので報告する。

2 実験方法

2.1 分析試料 (平田赤ネギ)

分析に用いた赤ネギは、平成 20 年 11 月に酒田市平田地区赤ネギ生産組合の圃場にて収穫されたものを分析に用いた。また、収穫した赤ネギは、 -50°C にて凍結し、必要量を解凍して各分析に用いた。

2.2 赤ネギのアントシアニン分析

赤ネギに 5%酢酸 (v/v) を加え、ホモジナイズ後、ろ過 (メンブレンフィルター, $0.45\mu\text{m}$) し、HPLC 分析の試料とした。HPLC 装置は日本分光 (株) 製 GULLIVER series 高圧グラディエントシステムを用いた。分析 HPLC 用のカラムは Migtysil RP-18 ($4.6\times\text{mm}$ i.d. \times 250

mm, 関東化学) を用い、カラム温度 40°C にて分析を行った。溶出溶媒に溶媒 A (5%酢酸-5%アセトニトリル, v/v) と溶媒 B (5%酢酸-50%アセトニトリル, v/v) を用いた。カラムを 5%溶媒 B で平衡化後、分析は 70 分で溶媒 B の濃度が 30%とする直線濃度勾配で行った。成分の検出には PDA 検出器 (MD915, 日本分光) を用い、検出波長は 510nm とした。標準試料として用いたシアニジン-3-O-グルコシドはフナコシ (株) から購入して使用した。

2.3 赤ネギアントシアニンの単離・精製および構造解析

赤ネギ (1kg) に 5%酢酸 2l を添加後、ホモジナイザーにて処理した。次いで 5%酢酸 8l を追加し、攪拌後、室温にて 24 時間静置し、アントシアニン成分の抽出を行った。この抽出液を吸引ろ過後 (5A 版), 500ml のイオン交換樹脂 DIAIONHP-20 (三菱化学製) に供し、2l の蒸留水で洗浄した。続いて 1.5l の 5%酢酸-80%エタノール溶液でアントシアニン成分を溶出し、これを 20ml に減圧濃縮した。さらに Sephadex LH-20 (ファルマシア製) カラム (25mmi.d. \times 900mm) を用い、エタノールにて平衡化後、分離・精製を行った。展開溶媒にはエタノールを用い、流速は $4\text{ml}/\text{min}$ とした。各アントシアニン画分を減圧乾固し、HPLC 溶媒 B 液 10ml に溶解後、さらに分取 HPLC にて精製した。分取 HPLC には COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (10mm i.d. \times 250mm) カラムを使用し、流速 $3.0\text{ml}/\text{min}$ で溶出した。その他は分析 HPLC と同様の条件で行った。

得られたアントシアニンは、分析 HPLC にて純度の検定を行い、単一成分になるまで精製

*山形大学農学部

を行った（ピーク面積比 98%以上）溶媒除去後、少量の 0.05%塩酸・メタノールに溶解し、過剰のジエチルエーテルを加えて沈殿を生成させた。沈殿物をシリカゲルデシケータ中で 24 時間減圧下で乾燥し、アントシアニンの塩酸塩とした。

単離した赤ネギアントシアニンについて、エレクトロスプレーイオン化二重収束磁場型質量分析計（マイクロマス社製、ZabspecQ）にて分析した。アントシアニンの測定は、正イオンのみを検出する陽イオンモードで行った（分子イオンピーク $m/z[M]^+$ ）。配糖体の検出はノズル電圧 3kV にて分析を行い、アグリコンの検出時には 7kV にて分析を行った。

さらに、単離した主要なアントシアニンに関しては 1H -, ^{13}C -, COSY-, DEPT-, HMBC-NMR スペクトル（日本電子製、JNM-EX 400FT-NMR スペクトルメーター）により構造解析を行った。

2.4 赤ネギのフラボノイド分析

赤ネギ（外皮，葉，可食部中心部，可食部外部）約 5g に 80% (v/v) エタノール 100ml を加え、ホモジナイザーにて処理した。さらに室温（約 20 °C）にて 24 時間静置し、フラボノイド成分の抽出を行った。これを、ろ紙(5A 版)およびメンブレン(0.45 μ m)にて順次ろ過し、

HPLC 分析の試料とした。HPLC 装置およびカラムはアントシアニンの分析に用いたものと同様のものを使用した。溶出溶媒には溶媒 C(0.05%リン酸-5%アセトニトリル, v/v), 溶媒 D(0.05%リン酸-50%アセトニトリル)を用い、カラムを 10%溶媒 D で平衡化後、D の濃度が 60 分で 40%, 90 分で 80%となる直線濃度勾配で行った。流速は 1.0 ml/min とし、検出は 360 nm で行った。また、標準試料として用いたケルセチン、ケルセチン-3-*O*-グルコシドはフナコシより購入し、ケルセチン-3, 4'-*O*-グルコシド、ケルセチン-4'-*O*-グルコシドは山形大学農学部食品栄養学研究室より分譲していただいた（成分同定後は、赤ネギより単離・精製して以下の実験に使用した）。

2.5 赤ネギポリフェノールのDPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) ラジカル消去活性

赤ネギ（葉，外皮を除いた可食部）および赤ネギ外皮（300g）に 80 %エタノール 1l を加え、ホモジナイザーにて粉碎した。次いで 80 %エタノール 2l を追加し、攪拌後室温にて 24 時間静置し、ポリフェノール成分を抽出した。この抽出液を吸引ろ過（5A 版）し、エタノール除去後（減圧濃縮），500ml のイオン交換樹脂 DIAIONHP-20（三菱化学製）カラムに供し、さらに 2.5l の蒸留水にて樹脂の洗浄を行った。続いて 1.5l の 80 %エタノールにて、ポリフェノール成分を溶出し、エタノール除去後凍結乾燥した。これを赤ネギポリフェノール画分としてラジカル消去活性の評価に用いた。

DPPH ラジカル消去活性の測定は、試験管にポリフェノール試料（適量をエタノールに溶解）0.4ml と 1.6ml の 100mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を加え、エタノールに溶解した 2.0ml の 0.5mM DPPH 溶液を混合、攪拌し、室温で 20 分間反応させた。反応後 517nm の吸光度を測定した。ポリフェノール試料の代わりにエタノールを用いて同様に測定したときの 517nm の吸光度をコントロールとした。また、

各種濃度の Trolox 溶液を用いた場合の吸光度を測定し、ラジカル消去活性値は Trolox 相当量 (mmol Trolox 相当量/g ポリフェノール) として示した。

ラジカル消去活性の比較のため、赤ネギの主要なフラボノイドであるケルセチン、ケルセチン-3-*O*-グルコシド、ケルセチン-4'-*O*-グルコシド、ケルセチン-3, 4'-*O*-グルコシドを同様に分析した。

2.6 赤ネギ外皮を用いたポリフェノール素材開発

赤ネギ外皮（出荷時に廃棄されたもの）を流水中で洗浄し、96 °Cにて 2% (v/v) 酢酸に浸漬処理を行った。処理時間は 90 秒、270 秒とし、処理後流水中で洗浄した。

また、赤ネギの重量に対して 2% (v/w) となるように酢酸を添加し、121 °Cにて 5 分間オートクレーブ処理し、同様に流水中にて洗浄した。これらを乾燥後（60 °C送風乾燥，10 時間処理），フードプロセッサーにて粉碎し、赤ネギ外皮食品素材とした。赤ネギ外皮食品素材の一般細菌数を測定するとともに、各フラボノイド成分を分析した。

3 実験結果および考察

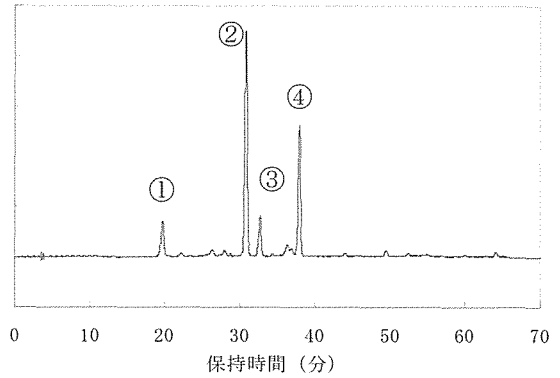
3.1 赤ネギのアントシアニン分析

赤ネギに含まれるアントシアニン成分の HPLC クロマトグラムを図1に示す。これより、4つの主要なアントシアニンのピークが検出された(ピーク No1 ~ 4)。これらピークの成分を単離・精製処理後、エレクトロスプレーイオン化質量分析計(以下 ESI-MS)にて分子量測定し、各アントシアニンに対する解析を行った。ESI-MS 分析によって検出された、各成分の分子イオンピーク(m/z)を表1に示す。ESI-MS 分析により、配糖体由来の分子イオンピーク([M]⁺)とアグリコン由来のフラグメントイオンを検出することが可能であった。ピーク No.1 は、ESI-MS にて m/z449([M]⁺)に分子イオンピーク、m/z287 にシアニジンによるフラグメントイオンが検出され、さらに、HPLC 分析による保持時間が標準試薬と一致したことから、シアニジン-3-O-グルコシドと同定された。

また、ピーク No.2 は、ESI-MS にて m/z535([M]⁺)に分子イオンピークを、m/z287 にシアニジンによるフラグメントイオンが検出され、m/z449 にシアニジン-グルコシドのフラグメントイオンが検出された。よって、ピーク No.2 はシアニジンとグルコース、マロン酸(m/z86)の存在が示唆された。

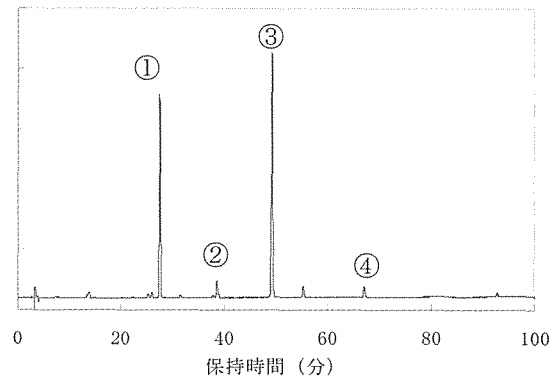
さらに、¹³C NMR(100 MHz, CF₃COOD-CD₃OD=1-9, TMS, δppm)スペクトルでは、シアニジンとグルコース由来のスペクトル値がシアニジン-3-O-グルコシドのスペクトル値とよく一致し、HMBC スペクトルでは、シアニジンの3位のカーボンシグナルとグルコース1位のプロトンシグナルとの間にクロスリンクシグナルが確認され、グルコース6位のプロトンシグナルとマロン酸1位のカーボンシグナルとの間にクロスリンクシグナルが確認されたことから、ピーク No.2 はシアニジン-3-O-(6"-O-マロニル)-グルコシドと同定された。

また、ピーク No.3、ピーク No.4 は ESI-MS の分析結果より、それぞれデルフィニジンおよびシアニジンに糖、もしくは有機酸等が結合し



①:シアニジン 3-O-グルコシド ②:シアニジン(6"-マロニル)-3-O-グルコシド
③:デルフィニジン配糖体 ④:シアニジン配糖体

図1 赤ネギアントシアニンの HPLC クロマトグラム (510nm)



①:ケルセチン 3,4'-O-グルコシド ②:ケルセチン 3-O-グルコシド
③:ケルセチン 4'-O-グルコシド ④:ケルセチン

図2 赤ネギフラボノイドの HPLC クロマトグラム (360nm)

た構造であることが推定された。

3.2 赤ネギのフラボノイド分析

赤ネギに含まれるフラボノイド成分の HPLC クロマトグラムを図2に示す。これより、4つの主要なフラボノイドのピークが検出された(ピーク No1 ~ 4)。これら成分について、HPLC 分析による保持時間が標準試薬と一致したことから、それぞれ、ケルセチン-3, 4'-O-グルコシド(ピーク No.1)、ケルセチン-3-O-グルコシド(ピーク No.2)、ケルセチン-4'-O-グルコシド(ピーク No.3)、ケルセチン(ピーク No.4)と同定された。

また、赤ネギ各部位のフラボノイド含有量を表2に示す。赤ネギは葉および可食部中心部位のフラボノイド含有量は低く、廃棄部位である外皮や可食部外側のフラボノイド含有量が非常に高いことを明らかにすることができた。また、

表1 赤ネギアントシアニンの主要成分

HPLC ピーク No.	分子イオン (アグリコン由来フラグメント) m/z[M+]	化合物 (分子量)
①	449(287)	シアニジン-3-O-グルコシド
②	535(287)	シアニジン-3-O-(6"-O-マロニル)-グルコシド
③	697(303)	デルフィニジン配糖体 (未同定)
④	577(287)	シアニジン配糖体 (未同定)

表2 赤ネギ各部位のフラボノイド含有量 (mg/100g 新鮮重量)

赤ネギ各部位	ケルセチン	ケルセチン-4-グルコシド	ケルセチン-3, 4'-グルコシド
外皮	177 ± 9.52	234 ± 73.1	63.0 ± 15.7
可食部 (外部)	8.12 ± 1.86	139 ± 4.45	108 ± 7.97
可食部 (中心部位)	0.48 ± 1.86	N.D	0.39 ± 0.36
葉部	0.51 ± 0.05	1.60 ± 0.50	1.44 ± 0.58

平均値 ± 標準偏差 (1 試料につき 3 回分析)

N.D(not detected)

可食部外側ではケルセチン-4'-O-グルコシドおよびケルセチン-3, 4'-O-グルコシドの含有量が高い値を示し、外皮ではケルセチン-4'-O-グルコシドおよびケルセチン含有量が高い値を示した。

3.3 赤ネギポリフェノールのDPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) ラジカル消去活性

赤ネギおよび赤ネギ外皮より調製したポリフェノール、さらに赤ネギポリフェノールの主要な構成成分であるフラボノイドのDPPH ラジカル消去活性を図3に示す。赤ネギ可食部より調製したポリフェノール画分のラジカル消去活性は低く、赤ネギ外皮より調製したポリフェノール画分は強いラジカル消去活性を示した。赤ネギの構成フラボノイドの中ではケルセチンのラジカル消去活性が最も強く、次いでケルセチン-3-O-グルコシド、ケルセチン-4'-O-グルコシド、ケルセチン-3, 4'-O-グルコシドの順であった。ここでフラボノイドのラジカル消去活性は、一般的にジフェニルプロパノイド(C₆-C₃-C₆)骨格におけるB環の構造(水酸基の数)に強く依存することが知られており¹⁾、B環の水酸基が一つグルコシル化されたケルセチン-4'-O-グルコシドのラジカル消去活性はケルセチンと比較し、顕著に低値を示した。また、ジフェニルプロパノイド(C₆-C₃-C₆)骨格におけるC環、3位の水酸基がグルコシル化されたケルセチン-3-O-グルコシドにおいても、ケルセチンと比較し、ラジカル

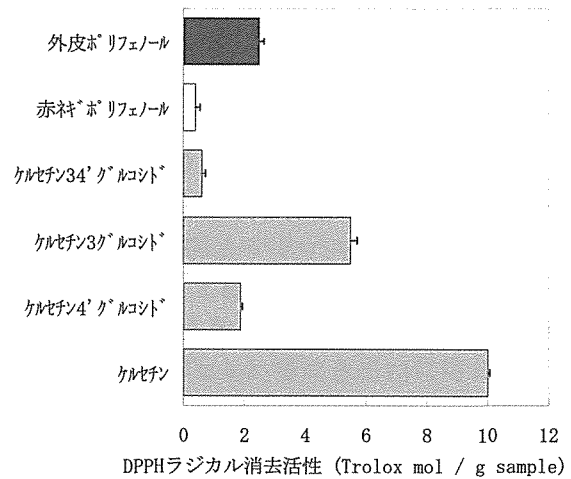


図3 赤ネギ調製ポリフェノールおよび各フラボノイド成分のDPPHラジカル消去活性

平均値 ± 標準偏差 (1 試料につき 3 回分析)

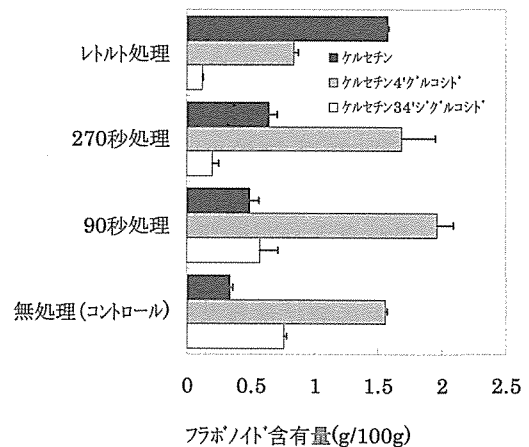


図4 赤ネギ外皮食品素材のフラボノイド含有量

平均値 ± 標準偏差 (1 試料につき 3 回分析)

消去活性が低い値を示すものの、C環3位の水酸基のラジカル消去活性に対する寄与度はB環の水酸基と比較し低いものと推察された。

3.4 赤ネギ外皮を用いたポリフェノール素材開発

出荷時に大量に廃棄される赤ネギ外皮を用い、酢酸-加熱処理によりフラボノイド配糖体の加水分解を行った。各処理条件により調製した赤ネギ外皮食品素材のフラボノイド含有量を図4に示す。2%酢酸にて加熱処理を行った試験区では、処理時間に依存して、ケルセチン-3,4'-*O*-グルコシドの含有量が減少し、ケルセチンの増加が認められた。さらに、酢酸を添加し、オートクレーブ処理を行った試験区では、ケルセチン-3,4'-*O*-グルコシドおよびケルセチン-4'-*O*-グルコシドが顕著に減少し、ケルセチン含有量の著しい増加が認められた。また、赤ネギ外皮の一般細菌数は非常に多く 8.6×10^6 個/gであったが、酢酸-加熱処理により、一般細菌数は顕著に減少し、2%酢酸、270秒処理およびオートクレーブ処理区では一般細菌は検出されなかった。

ここで、赤ネギに含まれるフラボノイドのなかで、マウスに四塩化炭素を投与して誘導した肝機能障害において、ケルセチンは有意にその抑制効果を示すものの、ケルセチン-4'-*O*-グルコシドやケルセチン-3,4'-*O*-グルコシドではその効果が減衰することが報告されている²⁾。また、ストレプトゾトシンを投与して誘導した糖尿病モデルマウスにおいて、ケルセチンが病態の改善効果を示すことが報告されている³⁾。酢酸-加熱処理により調製した赤ネギ外皮食品素材は、ケルセチン含有量が非常に高く、健康食品素材として有効である可能性が示唆された。

4 結 言

- 1)赤ネギに含まれる主要なアントシアニンとして、シアニジン-3-*O*-グルコシド、シアニジン-3-*O*-(6"-*O*-マロニル)-グルコシドを同定した。
- 2)赤ネギに含まれるフラボノイド4種を同定し、赤ネギ外皮に多量にフラボノイドが含まれることを明らかにした。また、赤ネギ外皮より調製したポリフェノール画分は強いラジカル

消去活性を示し、その構成成分の中でケルセチンが最も強いラジカル消去活性を示した。

- 3)赤ネギ外皮を活用し、酢酸-加熱処理によりケルセチン配糖体を加水分解し、ケルセチンを多量に含有する食品素材を開発することが可能であった。

文 献

- 1)鈴木建夫 他：老化制御と食品，2000，25項.
- 2)五十嵐喜治 他：日本食品科学工学会第56回大会要旨集，2009，144頁.
- 3)Kobori, M., *et al* : Mol. Nutr. Food Res., 2009, Vol. 53. p859-865.