

リンゴのプロシアニジン分析法

国立研究開発法人 農業・食品産業総合研究機構
果樹茶業研究部門 庄司 俊彦

【はじめに】

ポリフェノール類の一種であるプロシアニジン類は肥満や糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病の予防や抗アレルギー作用、育毛効果などさまざまな生体調節機能が報告されており、近年、生産者や消費者から注目されている機能性成分である。プロシアニジン類は、カテキンやその異性体であるエピカテキンが複数結合し、結合数（重合度）や結合位置、組み合わせによって多くの異性体が報告されている（図1）。プロシアニジン類を含有する我が国の代表的な農作物として、リンゴなどの果実があり、リンゴでは15量体までのプロシアニジン類がMALDI-TOF/MSによって確認されている。そのため、果実や食品中のプロシアニジン量を測定することの重要性が増している。

プロシアニジン類は多くの異性体が報告されており、市販の標準品が少なく、HPLCのクロマトグラム上の分離の問題があり、個別に分析することは困難である。また、比色定量法では、糖類や有機酸などの夾雑物質の影響により正確に測定することは困難である。本項では、リンゴ生果や加工食品中のプロシアニジン量を簡便な抽出法を用いて重合度別に個別定量するHPLC法について紹介する。

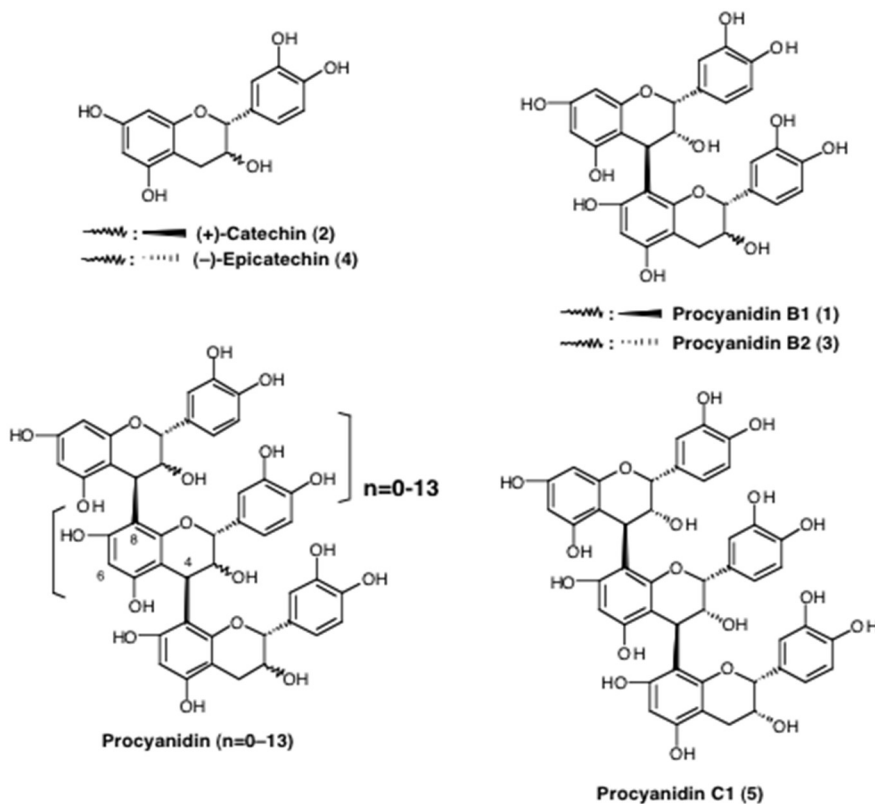


図1 リンゴの代表的なプロシアニジン類の構造式

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- ・ メスシリンダー(10ml, 50ml, 100ml, 300ml, 1000ml, 2000ml)
- ・ 葉さじ
- ・ コニカルチューブ (15ml, ポリプロピレン製)
- ・ 全量メスフラスコ (25ml, JIS R3505:1994, クラス A またはそれ以上の規格のもの)
- ・ プッシュボタン式マイクロピペッター (10ml)
- ・ パスツールピペット
- ・ メジューム瓶 (11, 21)
- ・ ホールピペット (10ml, 4ml)
- ・ メスピペット (20ml)
- ・ 遠心分離機 (15ml 容コニカルチューブが使用できローターが装備されていること)
- ・ 電子天秤 (0.0001g 単位で測定可能なもの)
- ・ 冷凍冷蔵庫 (-30℃, または-80℃で冷凍保存できること)
- ・ ワーリングブレンダーもしくは高速小型粉碎機
- ・ 凍結乾燥機 (カットしたリンゴ果実を凍結乾燥できるもの)
- ・ 高速振盪機 (同等の機能を有する器具でも良い)
- ・ メンブレンフィルター (PTFE 製, 孔径 0.45 μ m, 直径 25mm)
- ・ シリンジ (1ml, メンブレンフィルターが装着可能なもの)
- ・ HPLC 用サンプルバイアル
- ・ 高速液体クロマトグラフ (HPLC) システム

装置構成：送液ポンプ, 蛍光検出器 (励起波長 230nm, 蛍光波長 321nm に設定可能な蛍光検出器), カラムオープン, デガッサー, データ処理装置 (測定中にレンジの変更が可能なものが望ましい)

2. 試薬

1) プロシアニジン抽出溶媒

- ・ アセトン (特級)
- ・ 水 (HPLC 用あるいは純水製造装置により調製されたもの)
- ・ 酢酸 (特級)

2) HPLC 分析用溶媒

- ・ アセトニトリル (HPLC 用)
- ・ 水 (HPLC 用あるいは純水製造装置により調製されたもの)
- ・ メタノール (HPLC 用)
- ・ 酢酸 (特級)

3) プロシアニジン標準品 (純度 95%以上のもの)

既報⁸⁾に従い、リンゴ果汁から分取順相クロマトグラフィー法により単量体から 7 量体までのプロシアニジンを重合度別に分離後、標準品として使用する。

4) プロシアニジン B2 標準品

3. 調合・調製

1) プロシアニジン抽出溶媒

アセトン：水：酢酸（70:29.5:0.5）の調製

1000ml のメスシリンダーでアセトンを 700ml, 300ml のメスシリンダーで水を 295ml, 10ml のメスシリンダーで酢酸を 5ml それぞれ量りとり、3 液を 1l のメジウム瓶に入れよく混合する。

2) HPLC 分析用溶離液 A

A 液（アセトニトリル：水（v/v 98:2））の調製

2000ml のメスシリンダーでアセトニトリルを 1960ml, 50ml のメスシリンダーで水を 40ml 量り取り、2 液を 2l メジウム瓶に入れよく混合する。

3) HPLC 分析用溶離液 B

B 液（メタノール：水：酢酸（v/v/v 95:3:2））の調製

2000ml のメスシリンダーでメタノールを 1900ml, 100ml のメスシリンダーで水 60ml, 50ml のメスシリンダーで酢酸を 40ml 量り取り、3 液を 2l メジウム瓶に入れよく混合する。

4) プロシアニジン標準溶液の調製

標準品 1-7 量体をメタノール：水（1:1）の溶媒で溶解し、2~30 $\mu\text{g/ml}$ の範囲になるように希釈、調製し、標準として使用する。または、市販のプロシアニジン B2 をメタノール：水（1:1）の溶媒で溶解し、プロシアニジン B2 として換算することもできる。

【プロトコール】

1. 抽出

【リンゴ生果の場合】

- 1) 細切したリンゴ果実は酸化を防ぐため、液体窒素を加えた後、冷凍庫（ -80°C ）で保存する。
- 2) 凍結乾燥機で 4 日間乾燥させた後、粉砕機（ワーリングブレンダーもしくは高速小型粉砕機）で粉末状にする。
- 3) 粉末化した試料には、脱酸素剤を加え、抽出までの間、冷凍庫（ -30°C ）で保存する。
- 4) 粉末化した試料を薬さじで 0.5g (± 0.010) をコニカルチューブに精密に量り取り、記録する。
- 5) 試料を入れたコニカルチューブに 10ml のマイクロピペッターで抽出溶媒を 9ml 加え、高速振盪機で 10 分間激しく攪拌する（ $1800 \times \text{rpm}$ 相当）。
- 6) 攪拌後、コニカルチューブを遠心分離（ $1000 \times \text{rpm}$, 10°C , 15 分間）する。
- 7) 遠心分離後、パストゥールピペットで、沈殿を乱さないように注意しながらコニカルチューブ内の固形部以外の上清を 25ml 全量メスフラスコに移す。
- 8) 残った試料残渣に抽出溶媒を 8ml 加えて、同様に振盪機にかけて遠心し、上清を合一する。
- 9) 同様の操作を 1 回（合計 3 回抽出）行い、試料抽出液を合一した全量メスフラスコに抽出溶媒を加えて 25ml に定容する。
- 10) 転倒混和したものをメンブランフィルターでろ過し、HPLC 分析試料とする。

【リンゴジュースの場合】

- 1) ジュースの場合、25ml のメスフラスコにホールピペットで量り取ったジュースを 5ml 入れ、そこに 20ml のメスピペットでアセトン 17.5ml を加えた後、水で定容する。
- 2) 転倒混和したものをメンブランフィルターでろ過して、HPLC 分析試料とする。

2. HPLC 分析

1) HPLC 分析条件

- ・カラム：Inertsil WP300 Diol（内径 4.6×長さ 250 mm，GL サイエンス社製）
- ・カラム温度：35℃
- ・グラジェント条件：7%B 液で 3 分間流した後、60 分間で 30% まで直線勾配で増加、その後 70 分まで 100% で流し、初期条件（7%B 液）に戻して 80 分まで維持する。
- ・移動相流速：1.0 ml/min
- ・蛍光波長：励起波長 230 nm，蛍光波長 321 nm
- ・注入量：5 μ l
- ・約 30 分（4 量体と 5 量体のピークの間）からゲインを $\times 16$ に設定。
- ・プロシアニジン標準溶液の HPLC 分析を行い、ピーク面積から検量線を作成する（図 2）。

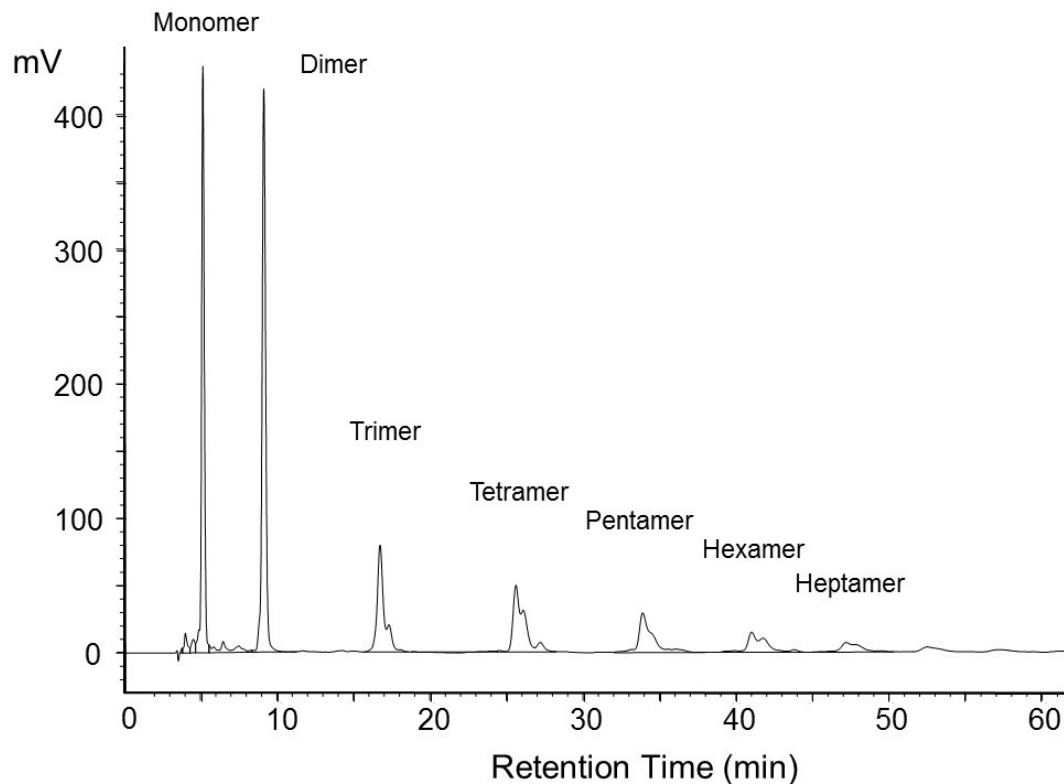


図 2 プロシアニジン標準溶液の HPLC のクロマトグラフ

2) プロシアニジン量の算出

重合度毎に、各濃度のプロシアニジン標準液から求められる検量線を作成し、求められた式から試料抽出液のプロシアニジン濃度(C_{Ex})を算出する。

$$C_{Ex} = a \times A_{Ex} + b$$

C_{Ex} = 試料抽出液のプロシアニジン濃度($\mu\text{g}/\text{l}$)

A_{Ex} = 試料抽出液のプロシアニジンのピーク面積(count)

次に、試料抽出液のプロシアニジン濃度(C_{Ex})からリンゴ試料中のプロシアニジン含量(C_{Ap})は、以下の式で算出される。

$$C_{Ap} = C_{Ex} \times 25 / W \times W_{\text{after}} / W_{\text{before}} \times 10^{-3}$$

C_{Ap} = リンゴ中のプロシアニジン含量($\mu\text{g}/\text{fresh weight g}$)

W = 測定試料重量(g)

W_{before} = 凍結乾燥前重量(g)

W_{after} = 凍結乾燥後重量(g)

25 = 試料抽出液量(ml)

10^{-3} = ml を 1 に変換

【プロトコールのポイント・注意点】

1. 凍結乾燥試料の調製の際、凍結乾燥前重量と凍結乾燥後重量（リンゴ果実の全重量、乾燥に使用する風袋量、リンゴの可食部重量、乾燥後の風袋込み重量）を計測記録し、乾燥重量減少率を算出しておく。
2. 乾燥粉末試料からの抽出で、コニカルチューブのキャップは振盪機にかけると緩みやすいので固く締める。

【おわりに】

プロシアニジン類は、リンゴ以外にもブドウや赤ワイン、カカオ、茶など様々な食品に含まれており、肥満予防や血糖値上昇抑制などの生活習慣病予防に関係する機能性成分として注目されている。本法を用いることで様々な食品のプロシアニジン含量の測定に応用可能である。近年、認可された機能性表示食品では、関与成分を定量することが求められており、リンゴなどの果実やその加工品のプロシアニジン量を正確に定量することが求められており、今後本分析法の活用が期待される。

【参考文献】

- 1) Shoji, T.; Mutsuga, M.; Nakamura, T.; Kanda, T.; Akiyama, H.; Goda, Y. (2003) Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.*, 51, (13), 3806-3813.
- 2) Shoji, T.; Masumoto, S.; Moriichi, N.; Kanda, T.; Ohtake, Y. (2006) Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of

polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J. Chromatogr. A*, 1102, (1-2), 206-213.

3) Obara M., Matsumoto S., Ono Y., Ozaki Y., Shoji T. (2016) Procyanidin Concentrations and H-ORAC of Apples Cultivated in Japan. *Food Sci. Tech. Res.*, 22 (4), 563-568, 2016.