

[成果情報名]大麦粉のフラバノールおよび総ポリフェノール含量を簡易に定量する方法

[要約]大麦粉のメタノール抽出液のフラバノール含量を DMACA 試薬を用いて定量すると、バニリン法と比べて検出感度が高い。また同じ抽出液を用いて総ポリフェノール含量を Folin-Denis 検出試薬を用いて定量すると、プルシアンブルー法に比べて発色が安定する。

[キーワード]大麦粉、ポリフェノール、Folin-Denis、DMACA、プロアントシアニジン、カテキン、定量法

[担当]近中四農研・大麦・はだか麦研究チーム

[連絡先]電話 0877-62-0800

[区分]近畿中国四国農業・作物生産、作物

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

大麦・はだか麦の需要・消費拡大のために既存品種よりポリフェノール含量を減らして炊飯麦がほとんど褐変しない品種育成が進んでいる。ポリフェノールの一種であるフラバノール（カテキン+プロアントシアニジン）は大麦の褐変に大きく寄与するため感度の高い定量方法が必要である。一方で機能性や耐病性の観点からは総ポリフェノール含量の重要性も指摘されており、育成系統の評価には簡易な定量方法が必要である。そこで少量の大麦粉のメタノールで振盪した抽出液を使い、DMACA および Folin-Denis 試薬を用いてフラバノールおよび総ポリフェノール含量を定量する手法を提示する。

[成果の内容・特徴]

1. フラバノールの定量方法は、カテキンおよびプロアントシアニジンの C8 位の炭素に結合する DMACA (4-dimethylaminocinnamaldehyde : Sigma 社) を検出試薬とする。精麦粉ないし原麦粉をメタノールで高速往復振盪抽出し、遠心分離後の上清を用いて標準の(+)-カテキンとの比色定量を行い、試料 1 g 当たりのフラバノール量を(+)-カテキン当量(nmol/g)で表す (図 1)。
2. DMACA 法は標準(+)-カテキンを 0 ~ 2 μg の量で検量線を書ける感度をもつ (図 2) ため 50 μg 以上を必要とするバニリン法と比較して高感度である。
3. 総ポリフェノールの定量方法は、Folin-Denis(フォリン-デニス)試薬を検出試薬とする。精麦粉または原麦粉にメタノールで振盪抽出し、Folin-Denis試薬と飽和炭酸ナトリウムを加えて混合後、遮光室温放置 1 時間に遠心し、(+)-カテキンとの比色定量を行い、試料 1 g 当たりのポリフェノール量を(+)-カテキン当量(mg/g)で表す (図 1)。
4. Folin-Denis 法による吸光度は発色後長時間 (7 時間) 経過しても安定している (図 3)。プルシアンブルー法は色調変化が早く (図 3)、試薬滴下から吸光度測定間の秒数まで合わせる必要があることや、測定溶液に濁りを生じて吸光度計測が難しくなることがあるが、Folin-Denis 法では問題とならない。
5. メタノールで抽出した液は-20℃で保存可能であり、DMACA 法と Folin-Denis 法の両方に適用できる (図 1)。

[成果の活用面・留意点]

1. 小型搗精機(サタケ社 TM-05)を用いて 60%歩留搗精した後、サンプルミル(サイクロテック 1093)で粉碎して精麦粉とした。粉量は必要に応じてスケールアップまたはダウンすることができる。
2. DMACA 法は発色は明瞭であるが吸光度は経時変化が早いので分析は 20 分以内に速やかに行う必要がある。また DMACA はインドールなどフラバノール以外の化合物にも結合することを留意する。
3. Folin-Denis試薬はSigma社の製品を用いる。発色原理はフェノール性水酸基がアルカリ側で示す還元力によりモリブデン酸が還元されて生じる青色を比色定量する。
4. 本法で利用した分光光度計は島津製作所 multispec1500 である。

[具体的データ]

大麦粉(精麦粉、原麦粉) 100mgをスクリーキャップ付きの50mlの遠心管に入れ1mlの100%メタノールを加える。

粉がダマにならないように Vortex mixer を数秒かけた後、高速往復振盪(200rpm)を室温で少なくとも1時間行う。

室温で遠心分離して上清を抽出液とする
(抽出液は-20°Cに保存可能)

試験管に抽出液(精麦粉200 μl、原麦粉50 μl)を入れ発色液1ml(0.1%DMACA/0.12N HCl-メタノール)を加えて混合する。

室温に10分間置く。

640nmの吸光度を測定する。

試験管に抽出液(大麦粉100 μl)に蒸留水1.6ml、Folin-Denis 試薬100 μlを加えて混合する。

飽和炭酸ナトリウム液を200 μl加えて混合する。

遮光保存して1時間後に室温で遠心分離する。

760nm(700nmでも可能)の吸光度を測定する。

遠心分離: 3000rpm(2000g) 10分とする。

比色定量: 検量線作成には、(+)-カテキン溶液(0.1mg/ml)を用いる。DMACA 法は(+)-カテキンが 0~2 μg、Folin-Denis 法は 0~6 μg が含まれるように抽出液と同量の希釈液を作る。これらを試験管に取り、抽出液と同様に吸光度を測定する。抽出液に含まれるフラバノール含量もしくは総ポリフェノール含量を求めた後、試料 1g 当たりの量に換算し、(+)-カテキン当量とする。

図1 測定法(左:DMACA 法によるフラバノール含量定量法
右:Folin-Denis 法による総ポリフェノール含量定量法)

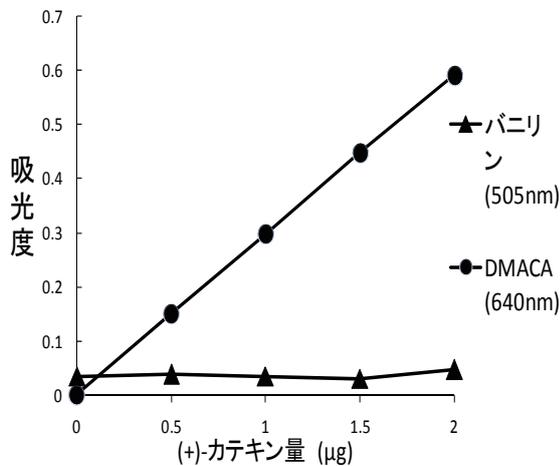


図2 DMACA法とバニリン法の感度の違い

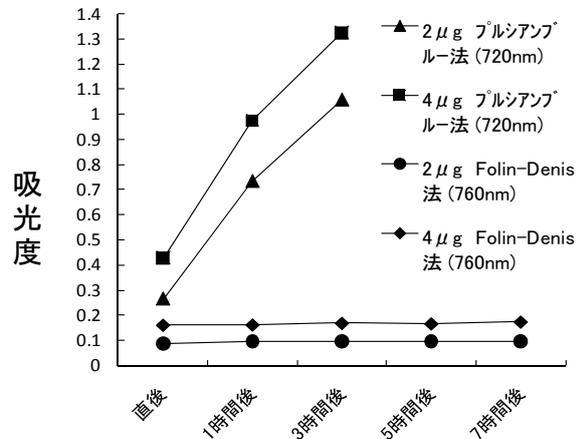


図3 標準物質(+)-カテキンの吸光度の経時変化

(柳沢貴司)

[その他]

研究課題名: 大麦・はだか麦の需要拡大のための用途別加工適性に優れた品種の育成と有用系統の開発

中課題整理番号: 311d

予算区分: 基盤、委託プロ(加工)

研究期間: 2006~2009年度

研究担当者: 柳沢貴司、神山紀子、阿部大吾、長嶺 敬、高橋飛鳥