

茨城県特産赤ネギ品種 ‘ひたち紅っこ’ に含まれる フラボノイドの同定と抗酸化活性評価

水野貴行^{1*}・中根理沙²・貝塚隆史³・石川（高野）祐子⁴・
立澤文見⁵・井上栄一^{2,6}・岩科 司^{1,2}

¹ 国立科学博物館植物研究部 305-0005 茨城県つくば市天久保

² 茨城大学大学院農学研究科 300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央

³ 茨城県農業総合センター園芸研究所 319-0292 茨城県笠間市安居

⁴ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門 305-8642 茨城県つくば市観音台

⁵ 岩手大学農学部 020-8550 岩手県盛岡市上田

⁶ 茨城大学農学部 300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央

Flavonoids from the Red Leaf Sheaths of *Allium fistulosum* ‘Hitachi-benikko’ (Ibaraki’s Specialty Red Welsh Onion Cultivar) and Their Antioxidant Activity

Takayuki Mizuno^{1*}, Risa Nakane², Takashi Kaidzuka³, Yuko Ishikawa-Takano⁴,
Fumi Tatsuzawa⁵, Eiichi Inoue^{2,6} and Tsukasa Iwashina^{1,2}

¹Department of Botany, National Museum of Nature and Science, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005

²Graduate School of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki 300-0393

³Horticultural Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago, Kasama, Ibaraki 319-0292

⁴Food Research Institute, NARO, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

⁵Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda, Morioka, Iwate 020-8550

⁶College of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki 300-0393

Abstract

Red welsh onion (*Allium fistulosum* L.) ‘Hitachi-benikko’, which has red leaf sheaths, was bred by Ibaraki Agricultural Center as a commercial vegetable in Ibaraki Prefecture. In this study, four anthocyanins including a novel glycoside [cyanidin 3-O-(3"-O-acetyl-6"-O-malonyl)-glucoside] and five flavonols were isolated and characterized by chemical and spectroscopic methods. The novel anthocyanin was the main component in the underground part of ‘Hitachi-benikko’. Of these flavonols, four were identified as quercetin and its glycosides, which are known to exhibit marked antioxidant activity. Furthermore, we measured the polyphenol content and antioxidant activity (H-ORAC) of the aerial and underground parts of ‘Hitachi-benikko’ and compared them with those of another general welsh onion cultivar. As the results, the reddish underground parts of ‘Hitachi-benikko’ showed higher polyphenol contents and antioxidant activities than the aerial parts of ‘Hitachi-benikko’ and those of the general welsh onion cultivar. These results promote the value of red welsh onion cultivar ‘Hitachi-benikko’ as a vegetable.

Key Words : added value, anthocyanin, quercetin, traditional vegetable

キーワード : アントシアニン, 伝統野菜, 高付加価値化, ケルセチン

緒 言

赤ネギは地下部の葉鞘が鮮やかな赤色を呈する長ネギの一種である。茨城県では明治時代より県北部城里町（旧桂村）坏（あくつ）地区で栽培される坏ネギが「地方野菜」の一つとして知られる赤ネギである。坏ネギは現在も在来系統を自家採種することで系統が維持されている。しかしながら、坏ネギの在来系統や選抜改良された市販品種では

地下部の赤色の発色が栽培環境に大きく影響されることから、茨城県農業総合センター園芸研究所では、坏地域から導入した在来系統をもとに、より安定的に発色し、地下部が在来系統よりも太い性質を持つ品種 ‘ひたち紅っこ’ を育成し、2008年に品種登録している（貝塚・鈴木、2006）。「ひたち紅っこ」は従来の品種よりも栽培が容易であることから、茨城県石岡市を中心に坏地区以外でも特産化が進んでおり、今後の生産増大も期待される。

赤ネギの特徴である地下部葉鞘の赤色を構成する色素成分はアントシアニンである。地下部におけるアントシアニンは様々な要因による酸化ストレスに対して、抗酸化物

質として機能することが知られ、食品科学分野でも機能性成分として注目されている (Scalbert・Williamson, 2000; Terao ら, 2008; Tsuda, 2012). また、山形県の酒田市特産の赤ネギ‘平田赤ネギ’においては、フラボノールである quercetin が強いラジカル消去活性を示すことが明らかになっている (菅原ら, 2010). このため、‘ひたち紅っこ’においても、食品の機能性の観点からの知見を得ることで付加価値が与えられると考えられた.

そこで、本研究では、赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’について、可食部である地下部のアントシアニンとその他のフラボノイド成分を同定した. さらに、総ポリフェノール量の測定と抗酸化活性を測定し、抗酸化食品としての有用性を調査した.

材料および方法

1. 材料

茨城県農業総合センターで栽培された赤ネギ‘ひたち紅っこ’ (*Allium fistulosum* L. ‘Hitachi-benikko’) を用いた (第1図). アントシアニンとその他のフラボノイドの分析 (試験1) には、2014年3月13日および2017年3月3日に播種後、ハウス地床育苗し、2014年6月25日および2017年6月4日に定植、その後、基肥 (N:P:K=0.7:2.5:0.7, $\text{kg} \cdot \text{a}^{-1}$) と土寄せ時の3回の追肥 (N:K=0.5:0.5, $\text{kg} \cdot \text{a}^{-1}$) を行い、2014年10月5日および2018年2月20日に収穫した‘ひたち紅っこ’を用いた.

総ポリフェノール量および抗酸化能の測定 (試験2) については、上記の2014年10月5日に収穫した‘ひたち紅っこ’を用いた. また、茨城県石岡市内で2013年10月



第1図 赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’ (*Allium fistulosum* L. ‘Hitachi-benikko’)

20日に播種し、2014年4月5日に定植、そして10月5日に収穫した白ネギ‘夏扇パワー’ ((株)サカタのタネ) を比較として用いた. 栽培は場における土壌はいずれも表層腐植質黒ボク土である.

2. 赤ネギ‘ひたち紅っこ’に含まれるアントシアニンとその他のフラボノイド (試験1)

1) 抽出と精製

赤ネギ‘ひたち紅っこ’の赤色の地下部 534.5 g を用いてアントシアニンおよびその他のフラボノイドの同定を行った. 地下部は8%ギ酸含メタノールを用いて、一晚抽出し、ろ過後に濃縮した. 濃縮液を5%ギ酸に溶解した後、アンバーライト XAD-7 (オルガノ(株)) を充填したカラムクロマトグラフィーにより粗精製を行った. 5%ギ酸含メタノールで回収した分画は、*n*-ブタノール:酢酸:水=4:1:5 (BAW, 上層, v/v/v) および、15%酢酸を展開溶媒としたペーパークロマトグラフィーによって分離した後、メタノール:水:酢酸 (70:25:5, v/v/v) を溶媒としたセファデックス LH-20 (GEヘルスケア・ジャパン(株)) カラムクロマトグラフィーによって精製した. 精製したアントシアニンおよびフラボノイドは分取 HPLC システム (CCPS デュアルポンプ & UV-8020 検出器, 東ソー(株)) で精製した. カラムは Inertsil ODS-4 (内径 10.0×250 mm, ジーエルサイエンス(株)) を用い、移動相はギ酸:アセトニトリル:水 (5:10:85, v/v/v), 検出波長は 530 nm (アントシアニン) または 350 nm (その他のフラボノイド) とした.

単離した色素は紫外・可視 (UV-Vis) 吸収スペクトルと分子量の測定を行い、基準標品がある場合には、TLC の R_f 値と HPLC による保持時間の比較を行った.

2) 吸収スペクトル測定

吸収スペクトルの測定は紫外・可視分光光度計 UV-2600 ((株)島津製作所) を用いた. アントシアニンは 0.01% 塩酸含メタノールに溶解した後に 220~700 nm の領域を測定した. また、試料に塩化アルミニウム (AlCl₃) を添加し、再度測定した. その他のフラボノイドは各成分をメタノールに溶かし、220~500 nm の領域を測定した. その後、Mabry ら (1970) および岩科 (2013) の方法に従い、各種反応試薬の添加による吸収極大の移動や特性から水酸基と糖の結合位置を推定した.

3) 質量分析

単離したフラボノイドは液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS, Shimadzu LCMS-2010EV, (株)島津製作所) で分子量の測定、および結合糖と有機酸の推定を行った. カラムは Inertsil ODS-4 (内径 2.1×100 mm) または L-column2 ODS (内径 2.1×100 mm) を用いた. 検出器電圧は 1.5 kV, イオン化法は Electrospray (ESI), 流速は 0.2 mL・min⁻¹, 検出波長は 530 nm (アントシアニン) または 350 nm (その他のフラボノイド), 移動相はギ酸/アセトニトリル/水 (5:10~20:85~75 または 1:18:81, v/v/v) を用いた.

アントシアニンのピーク **A4** については、0.5 mg を Fast atom bombardment mass spectra (FABMS) (JEOL JMS-700, 日本電子(株)) の測定に用い、色素の分子量を測定した。標準マトリックスにはグリセロールを用いた。その後、1 mg を High resolution (HR)-FABMS の測定に用い、色素の精密質量を測定した。

4) 薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析

セルロース薄層プラスチックプレート (メルク(株)) を用いた TLC 分析から Rf 値を求めた。アントシアニンについては立澤・篠田 (2005) で示された展開溶媒を、その他のフラボノイドについては Iwashina ら (2009) で示された展開溶媒を用いた。

5) アルカリケン化と加水分解

アシル化が推定されるアントシアニンについてはアルカリケン化処理を行った。処理はキシレン層を加えた後、2N 水酸化ナトリウム水溶液で行った。15 分静置した後、中和し、エーテル層と水層に分画した。

加水分解によるアグリコンと糖の同定については、Iwashina ら (2009) の手法に従って行った。

6) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析

HPLC (LC-20A システム, (株)島津製作所) 分析では、カラムは Inertsil ODS-4 (内径 6.0×150 mm) (アントシアニン) または L-column2 ODS (内径 6.0×150 mm, (一財)化学物質評価研究機構) (その他のフラボノイド) を用い、検出波長は 530 nm (アントシアニン) または 350 nm (その他のフラボノイド)、移動相には、リン酸/酢酸/アセトニトリル/水 (3:8:12:83, v/v/v/v) (アントシアニン) またはリン酸/アセトニトリル/水 (0.2:15:83, v/v/v) (その他のフラボノイド) を用いた。

7) NMR 測定

A4 については、最終的な同定を ¹H NMR (JEOL AL-400, 日本電子(株)) (2D COSY (correlation spectroscopy) と 2D NOESY (nuclear Overhauser and exchange spectroscopy) を含む) および ¹³C NMR (¹H-¹³C HMQC (heteronuclear multiple quantum correlation) と ¹H-¹³C HMBC (heteronuclear multiple bond coherence) を含む) で行った。溶媒は重メタノール (CD₃OD) : トリフルオロ酢酸 (TFA) = 9:1 (v/v) を用いた。

8) 単離されたアントシアニンとその他のフラボノイドの化学および分光特性

単離された4種類のアントシアニンと5種類のその他のフラボノイドの TLC, 紫外・可視吸収スペクトル, LC-MS および HPLC 特性は以下のとおりである。

A1 (Cyanidin 3-*O*-glucoside) : TLC : Rf 0.15 (BAW), 0.11 (BuHCl), 0.02 (1% HCl), 0.12 (AHW) ; UV-Vis λ_{max} (nm) : 0.01% HCl-MeOH 285, 533 ; E₄₄₀/E_{max} 54% ; +AlCl₃ 深色移動 ; LC-MS : *m/z* 449 [M]⁺, 287 [M-glucosyl]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 5.1.

A2 (Cyanidin 3-*O*-acetylglucoside) : TLC : Rf 0.13 (BAW), 0.25 (BuHCl), 0.02 (1% HCl), 0.14 (AHW) ; UV-Vis λ_{max}

(nm) : 0.01% HCl-MeOH 282, 538 ; E₄₄₀/E_{max} 23% ; +AlCl₃ 深色移動 ; LC-MS : *m/z* 491 [M]⁺, 287 [M-acetylglucosyl]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 7.7.

A3 (Cyanidin 3-*O*-(6"-*O*-malonyl)-glucoside) : TLC : Rf 0.15 (BAW), 0.19 (BuHCl), 0.03 (1% HCl), 0.17 (AHW) ; UV-Vis λ_{max} (nm) : 0.01% HCl-MeOH 283, 533 ; E₄₄₀/E_{max} 22% ; +AlCl₃ 深色移動 ; LC-MS : *m/z* 535 [M]⁺, 287 [M-malonylglucosyl]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 8.2.

A4 (Cyanidin 3-*O*-(3"-*O*-acetyl-6"-*O*-malonyl)-glucoside) : TLC : Rf 0.22 (BAW), 0.40 (BuHCl), 0.03 (1% HCl), 0.18 (AHW) ; UV-Vis λ_{max} (nm) : 0.01% HCl-MeOH 281, 528 ; E₄₄₀/E_{max} 24% ; +AlCl₃ 深色移動 ; LC-MS : *m/z* 577 [M]⁺, 287 [M-acetyl-malonylglucosyl]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 14.7 ; HR-FABMS calc. for C₂₆H₂₅O₁₅ : 577.1193. found : 577.1188 ; ¹H and ¹³C NMR (第1表).

F1 (Quercetin 3,4'-*di-O*-glucoside) : TLC : Rf 0.28 (BAW), 0.49 (15% HOAc), 0.40 (BEW) ; color UV (365 nm) : dark purple, UV/NH₃ : dark purple ; UV : λ_{max} (nm) MeOH 265, 346 ; +NaOMe 272, 371 (dec.) ; +AlCl₃ 271 ; 295sh, 351, 390sh ; +AlCl₃/HCl 274, 294sh, 350, 390sh ; +NaOAc 273, 375 ; +NaOAc/H₃BO₃ 265, 348 ; LC-MS : *m/z* 625 [M-H]⁻, 465 [M-monoglucosyl+H]⁺, 303 [M-diglucosyl+H]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 7.3.

F2 (Quercetin 3-*O*-glucoside, Isoquercitrin) : TLC : Rf 0.25 (BAW), 0.23 (15% HOAc), 0.20 (BEW) ; color UV (365 nm) : dark purple, UV/NH₃ : yellow ; LC-MS : *m/z* 465 [M+H]⁺, 303 [M-glucosyl+H]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 8.9.

F3 (Isorhamnetin 3-*O*-glucoside) : LC-MS : *m/z* 477 [M-H]⁻, 317 [M-glucosyl+H]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 21.8.

F4 (Quercetin 4'-*O*-glucoside, Spiraeoside) : TLC : Rf 0.41 (BAW), 0.06 (15% HOAc), 0.52 (BEW) ; color UV (365 nm) : dark purple, UV/NH₃ : dark purple ; UV : λ_{max} (nm) MeOH 253, 365 ; +NaOMe 278, 416 ; +AlCl₃ 264, 299sh, 353, 422 ; +AlCl₃/HCl 264, 299sh, 353, 422 ; +NaOAc 274, 394 ; +NaOAc/H₃BO₃ 253, 369 ; LC-MS : *m/z* 465 [M+H]⁺, 303 [M-glucosyl+H]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 31.9.

F5 (Quercetin) : TLC : Rf 0.72 (BAW), 0.02 (15% HOAc), 0.75 (BEW) ; color UV (365 nm) : yellow, UV/NH₃ : yellow ; UV : λ_{max} (nm) MeOH 256, 269, 371 ; +NaOMe Decomposition ; +AlCl₃ 270, 431 ; +AlCl₃/HCl 268, 297sh, 359, 427 ; +NaOAc 275, 331, 389 ; +NaOAc/H₃BO₃ 260, 294, 385 ; LC-MS : *m/z* 303 [M+H]⁺ ; HPLC : *tR* (min) 64.2.

3. アントシアニンおよびその他のフラボノイドの定量分析

定量分析は試料を地上部と地下部に分け、それぞれ破碎し、地上部 0.2 g に対して 2 mL 8% 酢酸メタノール、地下部は 0.2 g に対して 2 mL メタノールで一晩抽出し、HPLC

分析を行った。分析システムおよびカラムは定性分析と同様であるが、注入量は10 μL とし、25～30分にかけて流速を2倍 ($2.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)にした。得られた主要成分のピーク面積から量比を算出した。

4. 赤ネギ‘ひたち紅っこ’の地上部および地下部における総ポリフェノール量測定と抗酸化能（酸素ラジカル消去能）評価（試験2）

赤ネギ‘ひたち紅っこ’について、3～5本を1群として3反復の処理を行った。地上部と地下（赤色）部に分けた後、それぞれを約1 cmに裁断して縮分を行い、約200 gを液体窒素で直ちに凍結し、試料とした。試料は凍結乾燥後にグラインドミックス（GM200；ヴァーダー・サイエンティフィック（株））を用いて約300 meshの粉末とし、抽出時まで -30°C で保管した。試料の抽出は、凍結乾燥粉末1.0 gを精秤し海砂約5 gと混合後、自動高速溶媒抽出装置（ASE-350；旧：日本ダイオネクス（株）、現：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株））を用いて、ヘキサン：ジクロロメタン（1:1）に引き続き、メタノール：水：酢酸（90:9.5:0.5、以下MWAとする）による連続抽出を行った。得られたMWA溶液は総ポリフェノール量の測定ならびに抗酸化能評価に用いた。

総ポリフェノール量の測定は北爪ら（2011）の手法に基づき、フォリン-チオカルト法で行った。総ポリフェノール量は、100 g新鮮重に対する没食子酸相当量（mg gallic acid equivalent（GAE） $\cdot 100\text{ g FW}^{-1}$ ）で示した。

抗酸化能の測定はWatanabeら（2012）の手法に基づき、親水性酸素ラジカル消去能（H-ORAC）として評価した。96穴マイクロプレート（#353072, FALCON）に測定試料（希釈したMWA抽出液）50 μL 、フルオレセイン溶液（110.7 nM：75 mMリン酸緩衝pH 7.4）170 μL を加え、ラジカル発生剤であるAAPH溶液（31.7 mM：75 mMリン酸緩衝液、pH 7.4）75 μL を加えて振とう攪拌後、添加8分後から2分間隔で90分間、蛍光強度の経時変化を測定した。蛍光強度を経時的に記録したグラフの曲線下面積を

算出し、100 g新鮮重当たりのトロロックス当量（ $\mu\text{mol Trolox equivalent} \cdot 100\text{ g FW}^{-1}$ ）として算出した。

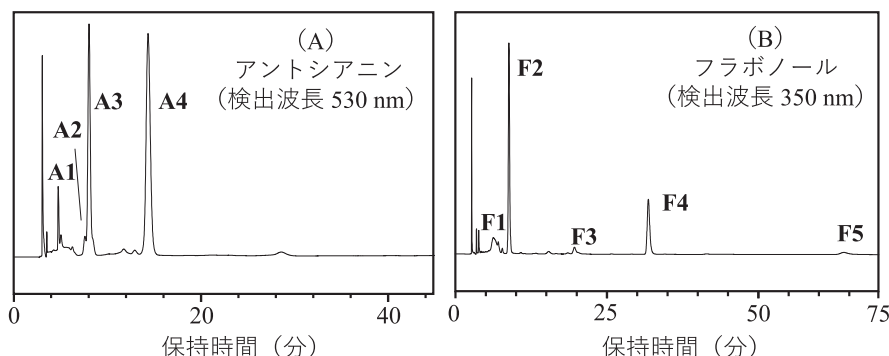
それぞれの試験においては平均値 \pm 標準誤差を示し、Tukey法でp値が5%以下の項目については有意差有りとした。

結 果

1. 赤ネギ‘ひたち紅っこ’に含まれるアントシアニンとフラボノール（試験1）

HPLCによるアントシアニンおよび、その他のフラボノイドの分析の結果を第2図に示した。アントシアニンは4種類が検出され、またその他のフラボノイドは5種類が検出された。その他のフラボノイドは、単離・精製後の同定の結果、いずれもフラボノールであった。

単離・精製した4種類のアントシアニン（A1～A4）のうち、A4からは、酸加水分解によってシアニジンとグルコースが検出された。またA4の分子量の測定から、各1分子のシアニジンとグルコースに加えて、各1分子のアセチル基とマロニル基の存在が推定された。さらに3位のみへの糖の結合が紫外・可視吸収スペクトル特性より推定された。A4の最終的な同定は $^1\text{H NMR}$ および $^{13}\text{C NMR}$ によって行った。プロトンおよびカーボンシグナルはCOSY, NOESY, HMQCおよびHMBCによって帰属された（第1表）。また、Andersen・Fossen（1995）で報告されているCyanidin 3-O-(3'',6''-di-O-malonyl)-glucosideのNMRデータを参考とした。 $^1\text{H NMR}$ では、シアニジンのプロトンシグナルとして、 δ 8.93（4位）、8.23（6'位）、7.98（2'位）、7.01（5'位）、6.89（8位）、および6.69（6位）が検出された。また、 $^{13}\text{C NMR}$ では、170.8～95.5 ppmに15個のアントシアニンに関わるシグナルが見られ、シアニジンの基本骨格が示された（第1表）。また、グルコースのアノメリックプロトン（ δ 5.38, d）、マロン酸のメチレン基のプロトン（ δ 3.44, brs）および酢酸のメチル基のプロトン（ δ 2.19, s）のケミカルシフトが示された。グルコース



第2図 赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’の地下部におけるHPLCプロフィール
検出波長530 nm（A：アントシアニン）と350 nm（B：フラボノール）

A1：Cyanidin 3-O-glucoside, A2：Cyanidin 3-O-acetylglucoside, A3：Cyanidin 3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside, A4：Cyanidin 3-O-(3''-O-acetyl-6''-O-malonyl)-glucoside, F1：Quercetin 3,4'-di-O-glucoside, F2：Quercetin 3-O-glucoside, F3：Isorhamnetin 3-O-glucoside, F4：Quercetin 4'-O-glucoside, F5：Quercetin

第1表 赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’のアントシアニン(A4)の¹H NMR (400 MHz) および¹³C NMR (100 MHz) データ^z

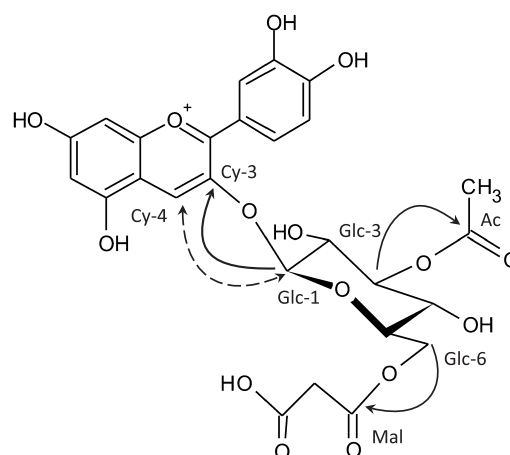
	δH^y	δC
Cyanidin		
2		164.4
3		145.5
4	8.93 s	137.0
5		159.3
6	6.69 d, (2.0)	103.7
7		170.8
8	6.89 d, (2.0)	95.5
9		157.9
10		113.4
1'		121.3
2'	7.98 d, (2.4)	118.5
3'		147.6
4'		156.0
5'	7.01 d, (8.8)	118.3
6'	8.23 dd, (8.8, 2.4)	128.6
3-O-glucosyl		
1	5.38 d, (7.8)	103.6
2	3.85 dd, (7.8, 9.5)	73.0
3	5.14 t, (9.4)	78.8
4	3.63 t, (9.6)	69.7
5	3.95 m	75.9
6a	4.34 dd, (12.0, 7.2)	65.3
6b	4.58 dd, (12.0, 1.7)	
3"-O-acetyl		
CH ₃	2.19 s	21.2
COOH		172.8
6"-O-malonyl		
CH ₂	3.44 brs	41.7 ^x
COOH		168.8
COOH		170.3

^z 溶媒には重メタノール (CD₃OD) : トリフルオロ酢酸 (TFA) = 9:1 を用いた

^y 表内の括弧は結合定数, 英数字はそれぞれ s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet, dd=double doublet, brs=broad singlet を示す

^x 検出されたシグナルは微弱であった

のアノメリックプロトンの結合定数が $J=7.8$ Hz であることから, グルコースは β 型であることが示された. 第3図に構造決定に重要となる HMBC および NOESY の相関を示した. HMBC では, グルコースのアノメリックプロトン (δ 5.38) とシアニジンの3位 (δ 145.5) のカーボン, グルコースの3位 (δ 5.14) のプロトンと酢酸のカルボキシル基のカーボン (δ 172.8) およびグルコースの6位のプロトン (δ 4.34, 4.58) とマロン酸のカルボキシル基のカーボン (δ 168.8) の相関が見られた. さらに NOESY でシアニジンの4位のプロトン (δ 8.93) とグルコースのアノメリックプロトン (δ 5.38) の間で相関が見られた. このことから, グルコースがシアニジンの3位, 酢酸がグルコー



第3図 A4 (Cyanidin 3-O-(3''-O-acetyl-6''-O-malonyl)-glucoside) の構造決定
実線矢印はHMBCにおける主な相関, 破線矢印はNOESYにおける主な相関を示す

スの3位, および, マロン酸がグルコースの6位の水酸基に結合していることが示された. これらの結果から, A4 は Cyanidin 3-O- β -(3''-O-acetyl-6''-O-malonyl)-glucopyranoside と同定された. この化合物はこれまでに報告のない新規のアントシアニンであった (Buckingham • Munasinghe, 2015).

A1~A3 のアントシアニンのうち, A1 は LC-MS によって分子イオンピーク m/z 449 [M]⁺ が検出され, さらにフラグメントイオンピーク m/z 287 [M-162]⁺ も検出されたことから, シアニジンに1分子のヘキソースが結合しているアントシアニンと推定された. 加水分解によって, シアニジンとグルコースが同定されたことから Cyanidin 3-O-glucoside と想定し, カエデ属植物 (*Acer* spp.) の紅葉から得られた標品の Chrysanthemine (Hattori • Hayashi, 1937) と HPLC によって比較したところ, 両者は完全に一致した. 以上より, A1 は Cyanidin 3-O-glucoside と同定された. A2 と A3 についても, 加水分解によって両者からシアニジンとグルコースが検出された. LC-MS によって, 分子イオンピーク m/z 491 [M]⁺ が A2 からおよび m/z 535 [M]⁺ が A3 から検出された. これはそれぞれ1分子の酢酸とマロン酸が結合している分子量に相当する. 以上のことから, A2 と A3 を Cyanidin acetylglucoside および Cyanidin malonylglucoside と推定した. A2 については紫外・可視吸収スペクトル特性により, Acetylglucoside が3位に結合していることは示されたが, 試料が僅少であったために酢酸の結合位置は決定できなかった. A3 については園芸キク (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) の花から得られた標品の Cyanidin 3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside (Nakayama ら, 1997) と HPLC によって比較したところ, 両者は一致した. A1, A3 および A4 の構造は第4図Aに示した.

5種類のフラボノールのうち, F5 については黄色の粉末として得られた. 各種試薬を添加しての紫外・可視吸収スペクトル特性から (Mabry ら, 1970), 3-, 5-, 7-, 3'-および

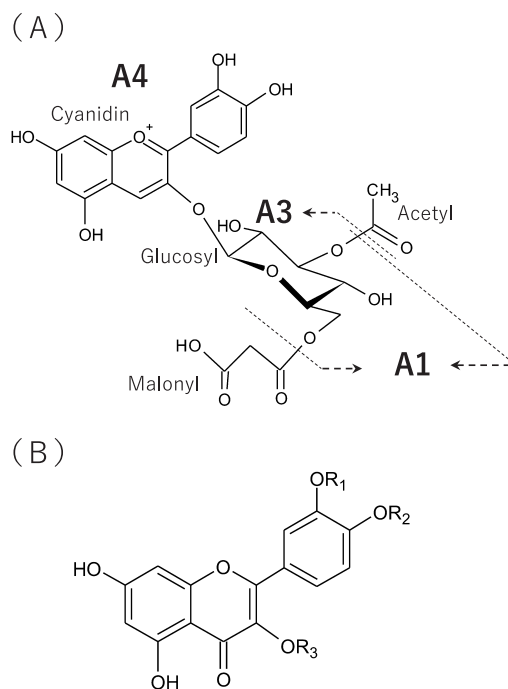
4'位に水酸基を有するフラボノールであることが判明し、またLC-MSによって分子量が302であることからQuercetinと推定し、*Astrophytum* spp. (サボテン科)の花から得られた標品のQuercetin (Iwashinaら, 1988)とHPLCおよびTLCで比較したところ一致した。

F2と**F4**は加水分解によって、Quercetinとグルコースを生成した。またLC-MSによって、両者ともに分子イオンピーク m/z 465 $[M+H]^+$ が検出された。これらのことから**F2**と**F4**はいずれもQuercetinに1分子のグルコースが結合した配糖体であることが判明した。グルコースの結合位置については、**F4**の紫外・可視吸収スペクトルの測定から、メタノール溶液へのナトリウムメチラート (NaOMe)の添加で長波長側の吸収極大 (Band I) が深色移動するが、著しい吸収曲線の変化 (分解) はなかったことから4'位の水酸基と推定された (Mabryら, 1970)。以上より**F4**はQuercetin 4'-O-glucosideであると推定された。結果として、**F2**と**F4**はヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana* L.)の葉から得られた標品のQuercetin 3-O-glucoside (Iwashina・Kitajima, 2009) および標品のQuercetin 4'-O-glucoside (Extrasynthese)とHPLCおよびTLCで比較したところ、**F2**はQuercetin 3-O-glucosideと、また**F4**はQuercetin 4'-O-glucosideと一致した。以上より、**F2**はQuercetin 3-O-glucoside (Isoquercitrin)と、**F4**はQuercetin 4'-O-glucoside (Spiraeoside)と同定された。

F1も加水分解によってQuercetinとグルコースが検出された。しかしLC-MSによって、分子イオンピーク m/z 625 $[M-H]^-$ が検出されたので、Quercetinに2分子のグルコースが結合していることが明らかになった。このグルコースの結合位置については、紫外・可視吸収スペクトルの測定により、メタノール溶液へのNaOMeの添加でBand Iが深色移動するが、吸収極大の吸光度が減少することから、4'位の水酸基が置換されていることがわかる。さらにメタノール溶液への塩化アルミニウム ($AlCl_3$) および塩化アルミニウム/塩酸 ($AlCl_3/HCl$)の添加から、Quercetinの5-, 7- および3'位の水酸基の存在が示された (Mabryら, 1970)。以上のことより、Quercetinの3位および4'位の水酸基にグルコースが結合していると推定し、これに対応する標品 (Extrasynthese)とHPLCおよびTLCで比較したところ、両者は一致した。これらの結果より、**F1**はQuercetin 3,4'-di-O-glucosideと同定された。

F3はLC-MSによって、分子イオンピーク m/z 477 $[M-H]^-$ が検出され、さらにフラグメントイオンピーク m/z 317 $[M-162+H]^+$ も検出されたことから、イソラムネチンに1分子のヘキソースが結合していることが推定された。**F3**をIsorhamnetin 3-O-glucosideと想定し、これに対応する標品 (Extrasynthese)とHPLCによる比較を行ったところ、両者は一致した。以上より、**F3**はIsorhamnetin 3-O-glucosideと同定された。**F1**~**5**の構造を第4図Bに示した。

また、HPLCによる定量分析の結果から、赤ネギ‘ひ



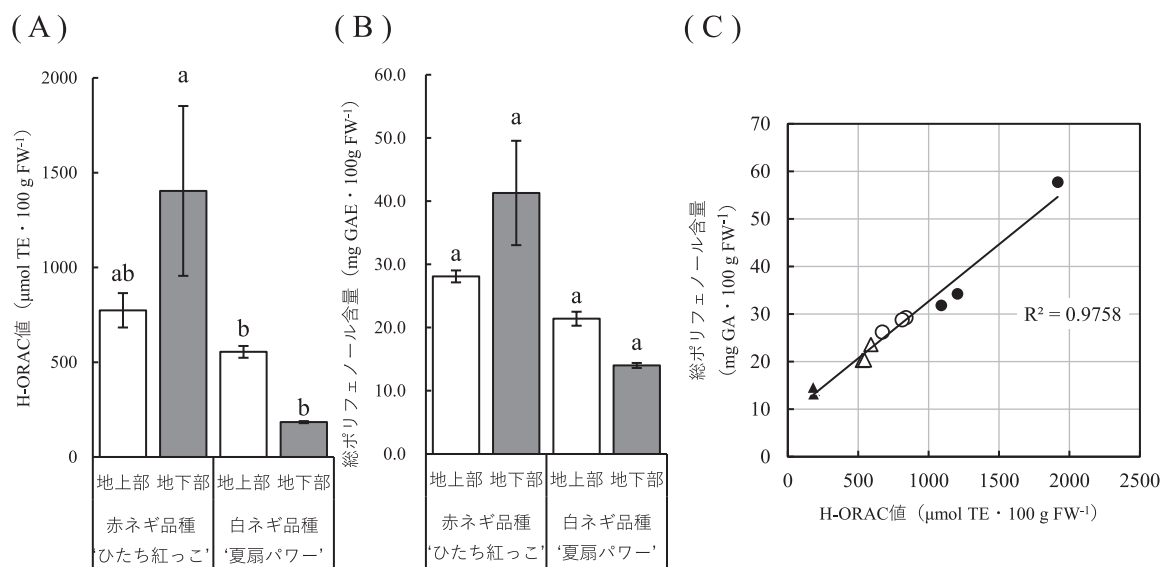
- F1** : $R_1=R_2=R_3$ =glucose
F2 : $R_1=R_2=H$, R_3 = glucose
F3 : $R_1=CH_3$, $R_2=H$, R_3 = glucose
F4 : $R_1=R_3=H$, R_2 = glucose
F5 : $R_1=R_2=R_3=H$

第4図 赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’から単離・同定されたアントシアニン (A) およびフラボノール (B)

たち紅っこ’の地下部のアントシアニンの量比は3.2% (**A1**), 2.5% (**A2**), 28.2% (**A3**) および44.3% (**A4**)であり、フラボノールの量比は3.0% (**F1**), 40.9% (**F2**), 3.6% (**F3**), 35.3% (**F4**) および1%以下 (**F5**)であった。以上より、アントシアニンについてはCyanidin 3-O-(3''-O-acetyl-6''-O-malonyl)-glucoside (**A4**)が最も多く、フラボノールについてはQuercetin 3-O-glucoside (**F2**)が最も多く含まれていることが判明した。地上部については、**F1**~**F5**はHPLCによっていずれも検出されず、Kaempferolの配糖体と考えられるピークが検出された (未公表データ)。このことから、地下部と地上部では、フラボノールの組成に差異があることが明らかになった。

2. 赤ネギ‘ひたち紅っこ’の地上部および地下部における総ポリフェノール量測定と抗酸化能 (酸素ラジカル消去能) 評価 (試験2)

赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’の地上部および地下部におけるH-ORAC値 ($TE \cdot 100 \text{ g FW}^{-1}$) は 774.0 ± 52.2 および 1404.0 ± 126.6 であった (第5図A)。一方、白ネギ栽培品種のH-ORAC値はそれぞれ 554.7 ± 31.5 および 184.2 ± 5.3 であった。結果として、‘ひたち紅っこ’の地下部が最も高い値を示し、白ネギ栽培品種の地上部、地下部のいずれ



第5図 赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’および白ネギ品種‘夏扇パワー’の地上部および地下部における総ポリフェノール含量とH-ORAC値

グラフ上(A・B)において、エラーバーは標準誤差(SE)を示す

また、異なる英文字間はTukey法により5%水準で有意差ありを示す(n=3)

(C)における白丸は‘ひたち紅っこ’の地上部、黒丸は‘ひたち紅っこ’の地下部、白三角は白ネギ品種の地上部、黒三角は白ネギ品種の地下部を示す

とも有意な差が見られた。‘ひたち紅っこ’の地下部の値はQuercetin高含量品種である赤タマネギの‘クエルリッチ’で報告されているH-ORAC値(1311.0±160.9)(渡辺ら, 2013)と同等であった。また、品種間で有意な差は見られなかったものの、地上部においても、白ネギ品種よりも赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’で高い値が示された。

総ポリフェノール量(GAE · 100 g FW⁻¹)は、‘ひたち紅っこ’の地下部で41.3±8.3と最も高くなり、次いで‘ひたち紅っこ’の地上部の28.1±0.9、白ネギ栽培品種の地上部(21.4±1.1)、地下部(14.0±0.4)となり、試験区の間で有意な差は見られなかった(第5図B)。

また、H-ORAC値および総ポリフェノール量の間では強い正の相関(R²=0.9758)が見られた(第5図C)。

考 察

赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’から単離されたアントシアニンには、いずれもCyanidinを基本骨格としていた。また、このうち3種類は脂肪族有機酸であるマロン酸か酢酸、あるいはその両方によりアシル化されたアントシアニンであった。さらにA4(Cyanidin 3-O-(3''-O-acetyl-6''-O-malonyl)-glucoside)はこれまでに報告のない新規のアントシアニンであった。これまでの研究から、Cyanidin 3-O-glucoside(A1)とCyanidin 3-O-(6''-O-malonyl)-glucoside(A3)は赤タマネギや平田赤ネギ、さらにはニンニク(*A. sativum* L.)の葉やチャイブ(*A. schoenoprasum* L.)の茎からも報告されている(Fossen・Andersen, 1997; Fossenら, 1996; 菅原ら, 2010; Teraharaら, 1994)。また、チャイブの花からは酢酸が

結合したアントシアニンが報告されている(Fossenら, 2000)。その他にも、イタリア産の赤タマネギなど、ネギ属におけるアントシアニンの報告は比較的多い(Donnerら, 1997; Fuleki, 1971; Gennaroら, 2002)。しかしながら、本研究で同定されたA4(Cyanidin 3-O-(3''-O-acetyl-6''-O-malonyl)-glucoside)はこれまでの報告では見られない化合物であった。

本研究で用いた‘ひたち紅っこ’の地下部(葉鞘部)から5種類のフラボノール、Quercetin 3,4'-di-O-glucoside(F1)、Quercetin 3-O-glucoside(F2)、Isorhamnetin 3-O-glucoside(F3)、Quercetin 4'-O-glucoside(F4)およびQuercetin(F5)を単離した。これらのうち、F3を除く4成分は平田赤ネギから報告されている成分であった(菅原ら, 2010)。また、赤タマネギからもF1, F4, およびF5が報告されている(Fossenら, 1998)。一方、Aoyama・Yamamoto(2007)の研究では、ネギの緑色可食部と白色可食部の主なフラボノールとしてKaempferolが報告されている。またノビル(*A. macrostemon* Bunge)の緑色部の主要フラボノイドとしてKaempferol 3,7-di-O-glucoside, 3,4'-di-O-glucoside, および3-O-glucosideなどが同定されている(Nakane・Iwashina, 2015)。本研究においても、緑色の地上部からはKaempferolの配糖体が検出されている(未発表データ)。このことから、フラボノイド組成には部位による差異があることは明らかなので、調査を行う際には留意する必要があると考えられた。

本研究では、フォルイン-チオカルト法による総ポリフェノール量の測定の結果から、赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’

の地下部は、‘ひたち紅っこ’の地上部、白ネギ栽培品種の地上部、および地下部のいずれよりも総ポリフェノール量が高いことが明らかになった。また、H-ORAC測定の結果も、総ポリフェノール量と同様の傾向が見られた。今回得られた‘ひたち紅っこ’の地下部の総ポリフェノール量およびH-ORAC値は、Quercetin含有量の高い品種として育成された赤タマネギ品種‘クエルリッチ’と同等の値であった（渡辺ら，2013）。

群馬県産の赤ネギを用いた過去の研究では、赤色部（葉鞘部外側）の抗酸化能が、白色部（葉鞘部内側）や緑色部（緑葉部）より高いことが示されるとともに、赤色部にQuercetinとアントシアニンを多く含んでいることが示され、高い抗酸化能にQuercetinとアントシアニンが関与していることが示唆されている（青山・山本，2006）。実際に様々な抗酸化物質のORAC法の測定値を比較した研究では、Quercetinは比較的高いORAC値（7～8 mol TE・mol⁻¹）を示している（渡辺ら，2009）。また、スモモウメの研究では、アントシアニンであるCyanidin 3-O-glucosideおよびrutinosideについて、高い抗酸化能が示されている（北爪ら，2011）。本研究においても‘ひたち紅っこ’の地下部にはQuercetinとアントシアニンとして、Cyanidinの配糖体が含まれており、これらの化合物が高い抗酸化性に関与していると考えられる。

また、本研究で同定された主要アントシアニンであるA4は、マロン酸と酢酸がそれぞれ1分子結合したポリアシル化アントシアニンであるが、ポリアシル化と‘ひたち紅っこ’の高い抗酸化活性との関連については、今後の調査が必要である。

我が国では、2015年より機能性表示食品制度が施行され、従来の特定保健用食品、栄養機能食品の2制度には含まれていなかった生鮮農産物も表示の対象となったことから、農産物の機能性に対する消費者の関心が高まっている。特にフラボノイドをはじめとするポリフェノールについては、それらを機能性関与成分とする100を超える機能性表示食品が上市されている（2019年9月現在、機能性表示食品に関する情報：消費者庁ウェブサイト https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/about_foods_with_function_claims/）。フラボノイドでは、Quercetinおよびその配糖体はB環にカテコール構造を有することから、高い抗酸化能を持つことが知られている（Ozgenら，2016；Zhengら，2017）。赤ネギと同様にネギ属の野菜であるタマネギはQuercetinを豊富に含み、食事由来のフラボノイド摂取源として最も有用であるとされる（室ら，2010，2015；Slimestadら，2007）。そこで、近年の食品抗酸化能への関心の高まりを受け、フラボノイドの中でも抗酸化能の強いQuercetinおよびその配糖体を高含有することを特徴とした品種として赤タマネギ品種‘クエルリッチ’が2008年に育成・登録された（室ら，2010）。さらに、‘クエルリッチ’よりもQuercetin含有量の高い黄タマネギ品種として、

‘クエルゴールド’が2016年に品種登録されるなど、抗酸化成分を高含有する品種開発が進んでいる（室ら，2015）。

本研究では、茨城県特産の赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’の赤色部において、新規のアントシアニンを含めた複数のフラボノイドが含まれていることを明らかにするとともに、一般的に流通する白ネギ品種‘夏扇パワー’よりも高い抗酸化能を有することを示した。本研究で得られた研究結果は赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’に付加価値を与える内容であり、今後のさらなる普及に貢献する可能性がある。

摘 要

赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’(*Allium fistulosum* ‘Hitachi-benikko’)は地下部の葉鞘が鮮やかな赤色を呈する長ネギで、茨城県北部城里町(旧桂村) 塚(あくつ) 地区で栽培される地方野菜から育成された。本研究では、赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’において、地下部のアントシアニンとフラボノールを同定するとともに、総ポリフェノール量と抗酸化能を測定し、抗酸化食品としての有用性を調査した。その結果として、赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’のアントシアニンとフラボノールについては、1種類の新規化合物(Cyanidin 3-O-(3"-O-acetyl-6"-O-malonyl)-glucoside)を含む4種類のアントシアニンと5種類のフラボノールを単離し、化学および分光分析により同定した。新規のアントシアニンは‘ひたち紅っこ’の地下部における主要アントシアニンであった。フラボノールについては、単離した4種類がいずれもQuercetinを基本骨格としていた。また、総ポリフェノール量と抗酸化能を測定した結果、赤色の地下部は、‘ひたち紅っこ’の地上部や、白ネギ品種の地上部および地下部と比べて、高い総ポリフェノール量と抗酸化能(H-ORAC)の値を示した。これらの結果は赤ネギ品種‘ひたち紅っこ’において、食品の機能性の面から付加価値を与えると考えられる。

謝 辞 材料の栽培や提供にご協力いただきました茨城県農業総合センター 園芸研究所 矢田和寛氏、JA新ひたち野の塚村直輝氏に心より御礼申し上げます。また、フラボノイドの単離・精製に協力いただいた、木内有希氏に御礼申し上げます。

引用文献

- Andersen, Ø. M. and T. Fossen. 1995. Anthocyanins with an unusual acylation pattern from stem of *Allium victorialis*. *Phytochemistry* 40: 1809–1812.
- 青山佐喜子・山本由喜子. 2006. 赤ネギの抗酸化活性と加熱調理による影響. *日本調理科学会誌*. 39: 283–288.
- Aoyama, S. and Y. Yamamoto. 2007. Antioxidant activity and flavonoid content of welsh onion (*Allium fistulosum*) and the effect of thermal treatment. *Food Sci. Technol. Res.* 13: 67–72.
- Buckingham, J. and V. R. N. Munasinghe. 2015. *Dictionary of*

- flavonoids with CD-ROM. CRC Press, Florida.
- Donner, H., L. Gao and G. Mazza. 1997. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. Food Res. Int. 30: 637–643.
- Fossen, T. and Ø. M. Andersen. 1997. Malonated anthocyanins of garlic *Allium sativum* L. Food Chem. 58: 215–217.
- Fossen, T., Ø. M. Andersen, D. O. Øvstedal, A. T. Pedersen and A. Raknes. 1996. Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. J. Food Sci. 61: 703–706.
- Fossen, T., A. T. Pedersen and Ø. M. Andersen. 1998. Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). Phytochemistry 47: 281–285.
- Fossen, T., R. Slimestad, D. O. Øvstedal and Ø. Andersen. 2000. Covalent anthocyanin-flavonol complexes from flowers of chive, *Allium schoenoprasum*. Phytochemistry 54: 317–323.
- Fuleki, T. 1971. Anthocyanins in red onion, *Allium cepa*. J. Food Sci. 36: 101–104.
- Gennaro, L., C. Leonardi, F. Esposito, M. Salucci, G. Maiani, G. Quaglia and V. Fogliano. 2002. Flavonoid and carbohydrate contents in Tropea red onions: effects of homelike peeling and storage. J. Agric. Food Chem. 50: 1904–1910.
- Hattori, S. and K. Hayashi. 1937. Studien über Anthocyane. II. Über die Farbstoffe aus den roten Herbstblättern von einigen *Acer*-Arten. Acta Phytochim. 10: 129–138.
- 岩科 司. 2013. 黄色系フラボノイド. p.141–200. 武田幸作・齋藤規夫・岩科 司編. 植物色素フラボノイド. 文一総合出版. 東京.
- Iwashina, T. and J. Kitajima. 2009. Flavonoids from the leaves of betalain-containing species, *Phytolacca americana* (Phytolaccaceae). Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B 35: 99–104.
- Iwashina, T., S. Ootani and K. Hayashi. 1988. On the pigmented spherical bodies and crystals in tepals of Cactaceous species in reference to the nature of betalains or flavonols. Bot. Mag. Tokyo 101: 175–184.
- Iwashina, T., T. Takemura and T. Mishio. 2009. Chalcone glycoside in the flowers of six *Corylopsis* species as yellow pigment. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78: 485–490.
- 貝塚隆史・鈴木雅人. 2006. 赤ネギ「ひたち紅っこ」の育成経過と特性. 茨城農総七園研報. 14: 1–7.
- 北爪雅恵・渡辺 純・後藤真生・石川 (高野) 祐子. 2011. 群馬県育成スモモウメ品種「紅の舞」の生体調節機能評価. 食科工誌. 58: 43–50.
- Mabry, T. J., K. R. Markham and M. B. Thomas. 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer, New York.
- 室 崇人・嘉見大助・杉山慶太. 2015. ケルセチン配糖体を高含有するタマネギ品種「クエルゴールド」の育成. 園学研. 14: 305–311.
- 室 崇人・野口裕司・森下昌三・伊藤喜三男・杉山慶太・近藤友宏・樽沼安壽彦・大野幸宏. 2010. ケルセチンを高含有する赤タマネギ新品種「クエルリッチ」の育成とその特性. 北海道農研七研報. 192: 25–32.
- Nakane, R. and T. Iwashina. 2015. Flavonol glycosides from the leaves of *Allium macrostemon*. Nat. Prod. Commun. 10: 1381–1382.
- Nakayama, M., M. Koshioka, M. Shibata, S. Hiradate, H. Sugie and M. Yamaguchi. 1997. Identification of cyanidin-3-*O*-(3",6"-*O*-dimalonyl- β -glucopyranoside) as a flower pigment of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 61: 1607–1608.
- Ozgen, S., O. K. Kilinc and Z. Selamoğlu. 2016. Antioxidant activity of quercetin: a mechanistic review. Turkish J. Agric. Food Sci. Technol. 4: 1134–1138.
- Scalbert, A. and G. Williamson. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J. Nutr. 130: 2073S–2085S.
- Slimestad, R., T. Fossen and I. M. Vågen. 2007. Onions: a source of unique dietary flavonoids. J. Agric. Food Chem. 55: 10067–10080.
- 菅原哲也・石塚 健・長 俊広・五十嵐喜治. 2010. 平田赤ネギのポリフェノールと食品開発. 山形県工業技術センター報告. 42: 73–77.
- 立澤文見・篠田浩一. 2005. フォトダイオードアレイ検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによるアントシアニンの同定と薄層クロマトグラフィーおよび分光光度計での吸収スペクトル特性を併用したアントシアニン同定の比較. 園学研. 4: 225–228.
- Terahara, N., M. Yamaguchi and T. Honda. 1994. Malonylated anthocyanins from bulbs of red onion, *Allium cepa* L. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1324–1325.
- Terao, J., Y. Kawai and K. Murota. 2008. Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 17 S1: 291–293.
- Tsuda, T. 2012. Anthocyanins as functional food factors—chemistry, nutrition and health promotion—. Food Sci. Technol. Res. 18: 315–324.
- 渡辺 純・室 崇人・柳田大介・山岸 喬・石川 (高野) 祐子. 2013. 北海道産タマネギ品種のケルセチン含有量と抗酸化能の差異. 食科工誌. 60: 563–566.
- Watanabe, J., T. Oki, J. Takebayashi, K. Yamasaki, Y. Takano-Ishikawa, A. Hino and A. Yasui. 2012. Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. Anal. Sci. 28: 159–165.
- 渡辺 純・沖 智之・竹林 純・山崎光司・津志田藤二郎. 2009. 食品の抗酸化能測定法の統一化を目指してORAC法の有用性と他の測定法との相関性. 化学と生物. 47: 237–243.
- Zheng, Y. Z., G. Deng, Q. Liang, D. F. Chen, R. Guo and R. C. Lai. 2017. Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. Sci. Rep. 7: 7543.