

ルチンの定量によるそば粉と小麦粉からなる混合品の混合割合の定量

大田朋楓*, 野妻義巳*, 天野千秋*, 朝長洋祐**

Determination of Buckwheat Content in a Mixture of Buckwheat Flour and Wheat Flour by Measurement of Rutin

Tomoki OTA*, Yoshimi NOZUMA*, Chiaki AMANO* and Hirosuke TOMONAGA**

*Kobe Customs Laboratory

12-1, Shinko-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0041 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Focusing upon rutin abundantly contained in buckwheat flour, we examined the buckwheat content in a mixture of buckwheat flour and wheat flour. Measurement of rutin was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Rutin was extracted from buckwheat flour with good reproducibility by refluxing in a water bath controlled at 80°C with 80% methanol or shaking at room temperature with 70% methanol. It was found that the buckwheat content could be calculated accurately by determining rutin in a flour mixture when each flour was presented.

1. 緒 言

現在、我が国で消費されているそばは、玄そばベースで年間12万トンに達し、その約8割が中国などから輸入されている。そばは、焼酎や菓子の原料にも用いられているが、主にそば粉としてめんの製造に使用されている。めんの製造工程において、そば粉につなぎとして小麦粉を混ぜることが古くから行われており、そのため、そば粉と小麦粉からなる混合品が製めん原料として広く取引されている。

税表分類上、そば粉と小麦粉からなる混合品は、その混合割合により、そば粉を主体とするものは税番第1102.90号（協定税率21.3%）に、小麦粉を主体とするものは税番第1101.00号（暫定税率27.4円/kg）に分類され、関税率が異なる。さらに、小麦粉を主体とするものについては「主要食糧の需給及び価格の安定に関する法律」の規定に基づき、62.6円/kgの納付金が必要となる。このことから、そば粉と小麦粉からなる混合品の混合割合を定量することは重要である。これまで、そば粉と小麦粉の混合割合は、全窒素量の定量、70%エタノール可溶性窒素量の定量、全アミノ酸組成の測定等により算出する方法が報告されている¹⁾。

そばは、必須アミノ酸の一つであるリジンの多い良質なたん

ぱく質を含み、また、ミネラルやビタミン類も豊富であることから、近年、健康食品としても注目されている。なかでも、そばに特徴的な成分として、他の穀物にはほとんど含まれないルチンの存在が挙げられる。ルチンは、フラボノイドの一種で、構造的には、ケルセチンと二糖類のルチノースが結合した配糖体である（Fig.1）。また、機能的には、毛細血管強化作用をもつことから、動脈硬化や高血圧の予防に効果のあることが知られている。

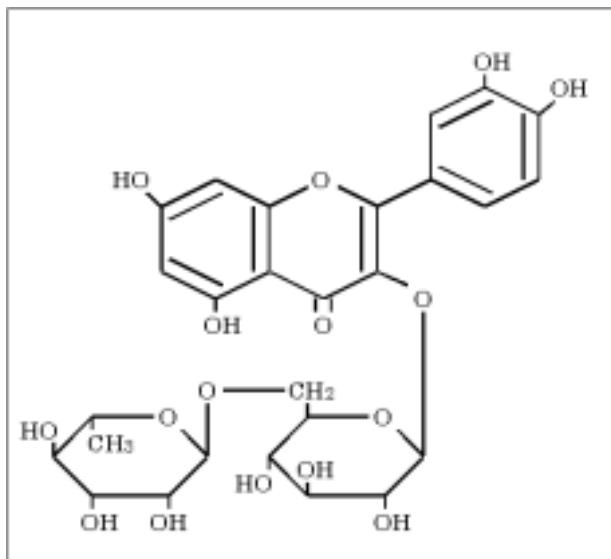


Fig.1 Chemical structure of rutin

* 神戸税関業務部 〒650-0041 神戸市中央区新港町12-1

** 財務省税關中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

今回、我々はそば粉に特徴的な成分であるルチンに着目し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC 法) によるルチンの定量により、そば粉と小麦粉からなる混合品の混合割合の定量について検討したので報告する。

2. 実験

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 試料

そば粉 (国産品2種、輸入品3種)

小麦粉 (国産品1種、輸入品1種)

2. 1. 2 試薬

ルチン (和光純薬製)

ケルセチン二水和物 (和光純薬製・化学用)

メタノール (和光純薬製・特級及びHPLC用)

アセトニトリル (和光純薬製・HPLC用)

しゅう酸二水和物 (和光純薬製・特級)

酢酸 (和光純薬製・特級)

2. 2 分析装置及び分析条件

装置：高速液体クロマトグラフ (HPLC) D-7000

(日立ハイテクノロジー社製)

カラム：Inertsil ODS-2 (4.6 mm I.D. × 150 mm)

(ジーエルサイエンス社製)

カラム温度：40°C

移動相：メタノール:水:0.5 mol/l しゅう酸水溶液=40:60:2

流速：1.0 ml/min

検出器：UV 検出器 (検出波長：360nm)

注入量：10 μl

2. 3 実験方法

2. 3. 1 HPLC 法によるルチンの測定条件の検討

ルチン及びケルセチンをそれぞれ約10 μg/ml 含有する80%メタノール溶液を調製した。この溶液を用いて、ルチン及びケルセチンのクロマトグラムを測定し、最適な組成の移動相を検討した。

また、そば粉及び小麦粉のメタノール抽出液のクロマトグラムを上記で検討した最適な移動相を用いて測定し、ルチンの定量が可能かどうか検討した。

2. 3. 2 検量線の作成

ルチン約100 mg を正確に量り取り、80%メタノールに溶解し、100 ml 容メスフラスコに移し入れ、定容する。これを希釀し、ルチンの濃度が0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μg/ml の溶液を調製し、HPLC によりクロマトグラムの測定を行った。ルチンの濃度と得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。

2. 3. 3 そば粉からのルチンの抽出

そば粉約5 g を丸底フラスコに正確に量り取り、40%–100%のメタノール水溶液をそれぞれ約40 ml 加え、還流冷却管を取り付

け、80°Cの湯浴中で一定時間抽出を行った。抽出液を冷却後、50 ml 容メスフラスコに移し入れ、定容し、ろ紙及び0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した。これを検液とし、HPLC によりクロマトグラムの測定を行った。ルチンの抽出量は、上記2. 3. 2で作成した検量線から求めた検液中のルチンの濃度及び試料採取量から、次式により算出した。

$$\text{ルチンの抽出量 (mg/100g)} = \frac{C \times 50}{S \times 10}$$

C : 検液中のルチンの濃度 (μg/ml)

S : 試料採取量 (g)

2. 3. 4 室温でのルチンの抽出

そば粉約5 g を50 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、40%–100%のメタノール水溶液をそれぞれ約40 ml 加え、室温で一定時間振とう抽出を行う。50 ml に定容し、ろ紙及び0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した。これを検液とし、HPLC によりクロマトグラムの測定を行った。ルチンの抽出量は、上記2. 3. 3と同様の方法で算出した。

2. 3. 5 各種試料からのルチンの抽出

そば粉5種及び小麦粉2種から上記2. 3. 3及び2. 3. 4で検討した最適な条件を用いてルチンを抽出し、その抽出量を定量した。

2. 3. 6 そば粉と小麦粉からなる混合品の混合割合の定量

そば粉と小麦粉をそれぞれ正確に量り取り、そば粉の混合割合が既知の混合品を調製した。この調製した混合品及びそば粉、小麦粉から2. 3. 3及び2. 3. 4で検討した最適な条件を用いてルチンを抽出し、その抽出量を定量した。これらの抽出量から、次式によりそば粉の割合を算出した。

$$\text{そば粉の割合 (\%)} = \frac{M - W}{B - W} \times 100$$

M : 混合品からのルチンの抽出量 (mg/100g)

W : 小麦粉からのルチンの抽出量 (mg/100g)

B : そば粉からのルチンの抽出量 (mg/100g)

3. 結果及び考察

3. 1 HPLC 法によるルチンの測定条件の検討

これまで、そば粉に含まれるルチンの定量法として、C8カラムを用いた HPLC 法が報告されている²⁾。ここでは、汎用性が高く、税関分析でよく用いられている ODS カラムにより、ルチンの定量を行うこととした。また、検出波長は、ルチンの極大吸収波長である360 nm を用いた。

3. 1. 1 ルチンを用いた移動相の検討

そば粉には、ルチンのほかにそのアグリコンであるケルセチンを微量含むことが知られている。そこで、ルチンとケルセチンの混合溶液を調製し、これを用いて移動相の検討を行った。

逆相カラムを用いた HPLC 法の移動相としては、一般的に、水–メタノール及び水–アセトニトリルの混合溶媒が用いられる。

まず、移動相にイオン対試薬として2.5%酢酸を含む水-メタノールの混合溶媒のメタノール濃度について検討を行った。移動相中のメタノール濃度を80%から順次減少させて測定を行ったところ、メタノール濃度が40%の時が適当であった。しかし、ピーク形状を見てみると、ケルセチンのピークで明らかなように、ルチンのピークでもテーリングが確認された (Fig.2)。そこで、イオン対試薬を酢酸からしゅう酸に変更し測定を行った。その結果、40%メタノールにしゅう酸を添加した移動相では、ルチンのピーク対称性は良好なものとなった (Fig.3)。

次に、水-アセトニトリルの混合溶媒について検討を行った。20%アセトニトリルにしゅう酸を添加した移動相を用いたところ、ピーク対称性は良好であった (Fig.4)。従って、しゅう酸を添加した20%アセトニトリルも移動相として適当と考えられる。しかし、メタノール系の移動相と比較すると、ルチンに対するケルセチンの保持時間は長くなかった。このことから、アセトニトリル系の移動相を用いて、そば粉中のルチンの定量を行った場合、分析時間はメタノール系の移動相を用いたときより長くなると考えられる。

以上のことから、そば粉に含まれるルチンの定量に用いる移動相として、40%メタノールにしゅう酸を添加した溶媒が適当と考えられる。

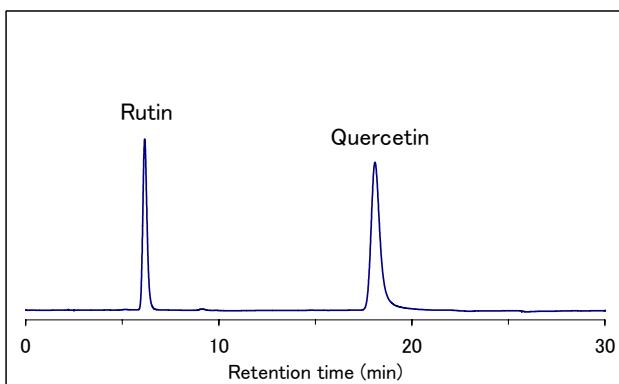


Fig.2 HPLC chromatogram of rutin and quercetin
Mobile phase : 40% CH_3OH , 2.5% CH_3COOH

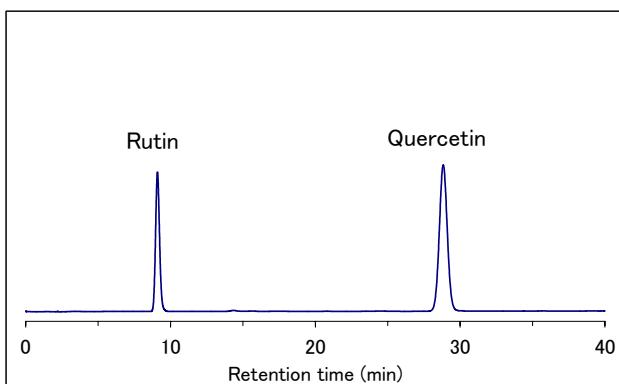


Fig.3 HPLC chromatogram of rutin and quercetin
Mobile phase : $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} : 0.5 \text{ mol/l oxalic acid} = 40 : 60 : 2$

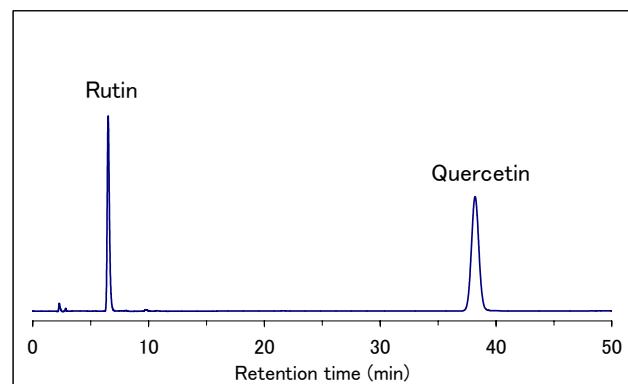


Fig.4 HPLC chromatogram of rutin and quercetin
Mobile phase : $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : 0.5 \text{ mol/l oxalic acid} = 20 : 80 : 2$

3. 1. 2 試料を用いた検討

Fig.5に、移動相として40%メタノールにしゅう酸を添加した溶媒を用いて測定したそば粉及び小麦粉のメタノール抽出物のクロマトグラムを示す。そば粉のメタノール抽出物のクロマトグラムでは、ルチンの顕著なピークが確認され、ピーク付近のベースラインも比較的安定であることが分かった。また、保持時間が28.8分付近に、ケルセチンのピークも非常に小さいが確認された。

一方、小麦粉のメタノール抽出物のクロマトグラムでは、ルチンのピークは確認されず、また、ルチンの定量を妨害するようなピークも確認されなかった。

以上のことから、そば粉中のルチンの定量に用いる移動相として、40%メタノールにしゅう酸を添加した溶媒が適当であることが確認された。

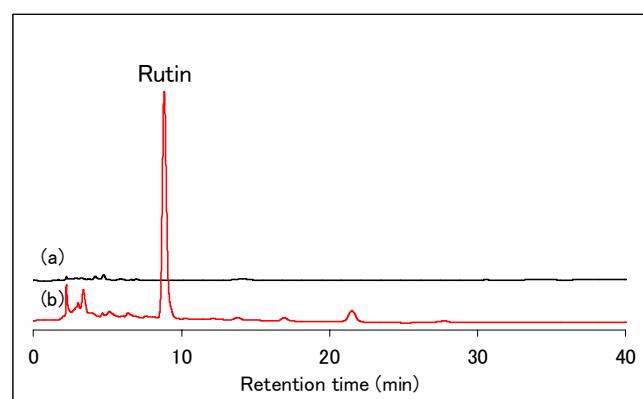


Fig.5 HPLC chromatograms of wheat flour (a) and buckwheat flour (b), separate condition is same that showed in Fig.3

3. 2 検量線の作成

ルチンの濃度が0.5-100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で検量線の作成を行った結果をFig.6に示す。ルチンの濃度とピーク面積の相関係数は0.9999であり、ほぼ原点を通る良好な直線性を示した。

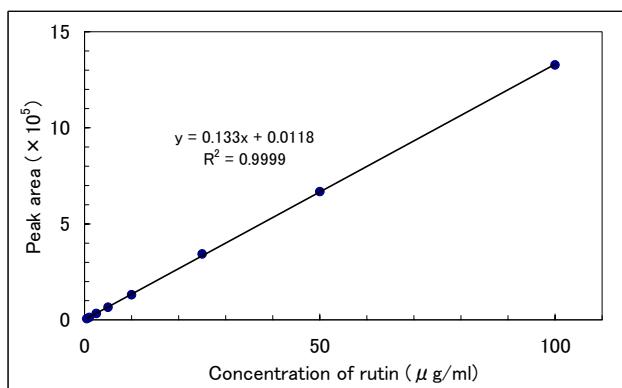


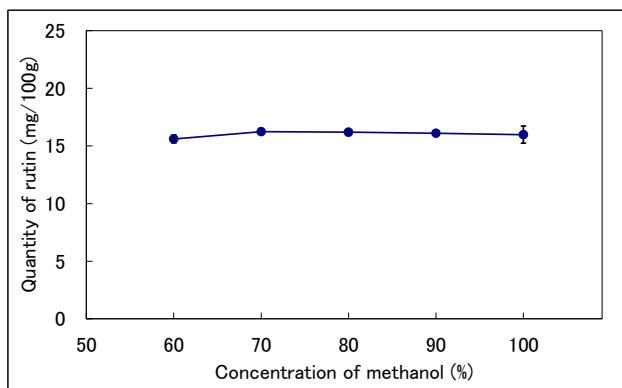
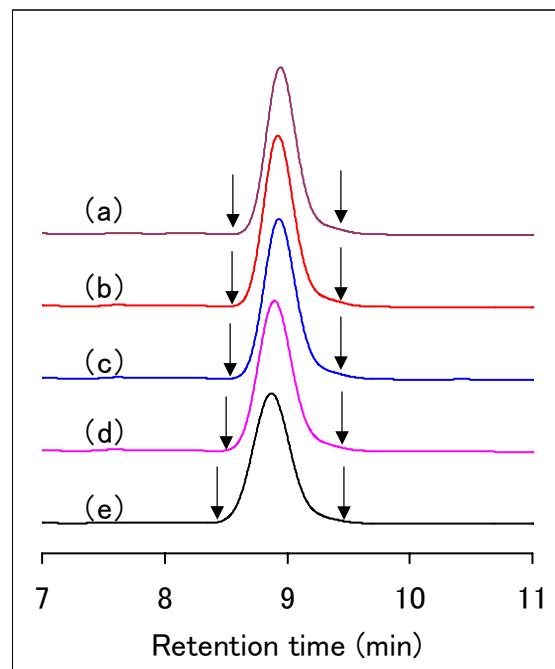
Fig.6 Calibration curve of rutin

3. 3 そば粉からのルチンの抽出

そばには、ルチン分解酵素が含まれておらず、その酵素の働きにより、ルチンはケルセチンとルチノースに加水分解されることが知られている。そこで、酵素の失活する80°Cでルチンの抽出を行った。

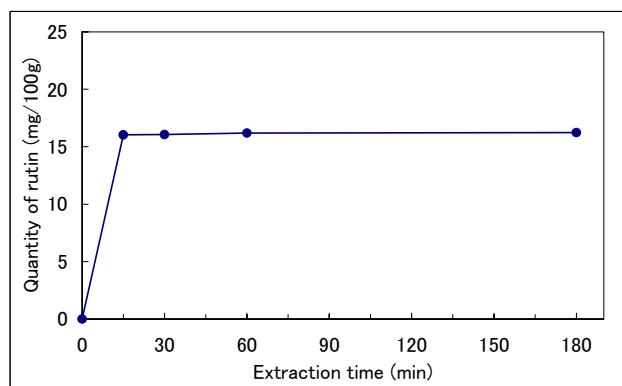
3. 3. 1 抽出溶媒のメタノール濃度

Fig.7にルチンの抽出量と抽出溶媒として用いたメタノール水溶液の濃度との関係を示す。ルチンの抽出量は、メタノール濃度が70–100%の範囲ではほぼ一定であったが、60%メタノールでは、若干減少していることが分かった。また、メタノール濃度が50%以下では、抽出液は糊状となり、定量できなかった。さらに、ルチンのピーク幅をメタノール濃度で比較すると、90–100%のメタノール水溶液では、70–80%のメタノール水溶液を用いた場合よりピーク幅が広いことが分かった (Fig.8)。このことから、ルチンの抽出溶媒は、70%ないし80%メタノールが適当と考えられる。

Fig.7 Effect of methanol concentration on the extraction of rutin
Rutin was extracted by refluxing in a water bath controlled at 80°C for 60 min.Fig.8 HPLC chromatograms of buckwheat flour extracted by methanol aqueous solutions of various concentration
Methanol concentration : (a) 60%, (b) 70%, (c) 80%, (d) 90%, (e) 100%
Arrows indicate positions of peak-start and peak-end.

3. 3. 2 抽出時間

Fig.9に80%メタノールを用いて、80°Cで抽出を行った時のルチンの抽出量と抽出時間の関係を示す。ルチンの抽出量は15–180分の範囲で一定であった。このことから、ルチンの抽出時間は、15分以上必要であると考えられる。

Fig.9 Dependence of extraction time on the extraction of rutin
Rutin was extracted by refluxing in a water bath controlled at 80°C with 80% methanol.

3. 3. 3 繰り返し精度

Table 1に80%メタノールを用いて、80°Cで60分間抽出を行ったときのルチンの抽出量を示す。測定を10回行った結果、その変動係数は1.1%であり、良好な再現性が得られた。

以上のことから、そば粉中のルチンは、80%メタノールを用いて、80°Cで60分間抽出を行うことにより、安定して抽出でき

ることが分かった。

Table 1 Reproducibility of quantity of rutin extracted by being refluxing in a water bath controlled at 80°C with 80 % methanol for 60 min.

Quantity of rutin (mg/100g)	
1	16.2
2	16.0
3	16.2
4	16.2
5	16.0
6	16.3
7	16.4
8	16.3
9	16.6
10	16.3
mean	16.3
S.D.	0.17
C.V. (%)	1.1

3. 4 室温でのルチンの抽出

実験操作の簡便性を図るため、そば粉からのルチンの抽出を室温での振とう抽出により行った。この場合、メスフラスコを用いて抽出操作が行えるため、移し替えによる誤差がないという利点があるが、酵素によるルチンの加水分解に注意する必要がある。

3. 4. 1 抽出溶媒のメタノール濃度

Fig.10に室温で60分間振とう抽出した時のルチンの抽出量とメタノール濃度の関係を示す。ルチンの抽出量は、70%メタノールを用いた場合で最大となり、その抽出量は、80°Cで80%メタノールを用いて抽出した場合とほぼ同じであった。また、メタノール濃度が80%以上及び60%以下では、ルチンの抽出量は、70%メタノールと比較して減少していた。

次に、室温での振とう抽出を180分間行い、ルチンの抽出量を定量した。メタノール濃度が80%以上では、抽出時間が長くするとルチンの抽出量は増加した。このことは、メタノール濃度が高いと抽出速度が遅く、室温において60分ではルチンの抽出が不十分であることを示している。一方、メタノール濃度が60%以下では、抽出時間を長くするとルチンの抽出量は減少し、さらに、抽出溶媒中のケルセチンの量が増加した。このことは、メタノール濃度が低い場合、室温では抽出されたルチンが酵素の働きにより加水分解されたことを示している。

以上のことから、室温で抽出を行う場合、そば粉からのルチンの抽出速度が比較的速く、酵素の影響がほとんどない70%メタノールが適当と考えられる。

3. 4. 2 抽出時間

Fig.11に70%メタノールを用いて、室温で抽出を行った時のルチンの抽出量と抽出時間の関係を示す。ルチンの抽出量は30—180分の範囲で一定であった。このことから、ルチンの抽出時間は、30分以上必要であると考えられる。

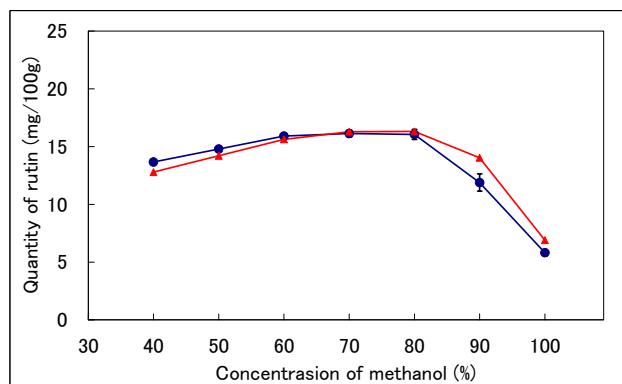


Fig.10 Effect of methanol concentration on the extraction of rutin
Rutin was extracted by shaking at room temperature for 60 min (●) or 180 min (▲).

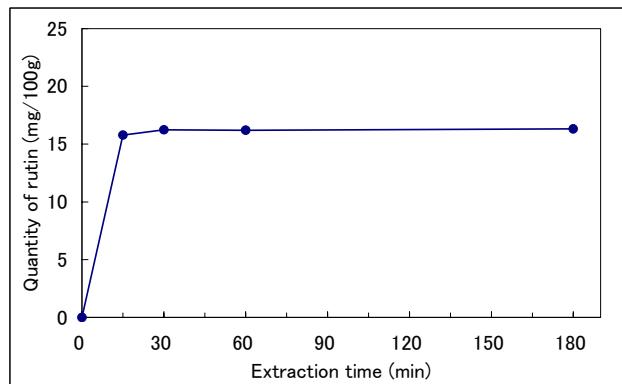


Fig.11 Dependence of extraction time on the extraction
Rutin was extracted by shaking at room temperature with 70% methanol.

3. 4. 3 繰り返し精度

Table 2に70%メタノールを用いて60分間、室温で振とう抽出を行ったときのルチンの抽出量を示す。ルチンの抽出量の測定を10回行った結果、その変動係数は1.8%であり、良好な再現性が得られた。

以上のことから、70%メタノールを用いて60分間、室温で振とう抽出を行う方法も、簡便法として、そば粉中のルチンの抽出に有効であることが分かった。

Table 2 Reproducibility of quantity of rutin extracted by shaking at room temperature with 70% methanol for 60 min

Quantity of rutin (mg/100g)	
1	16.4
2	16.4
3	16.3
4	15.9
5	15.7
6	15.8
7	16.2
8	16.6
9	16.0
10	15.7
mean	16.1
S.D.	0.29
C.V. (%)	1.8

3. 4. 4 検液中のルチンの経時変化

HPLC で測定を行う場合、抽出された検液中のルチンが、経時変化により加水分解される可能性が考えられる。そこで、70% メタノールを用いて60分間、室温で振とう抽出を行った検液を、40分毎に HPLC に注入し、ルチンの量を測定した。また、検液は、冷却ユニットを用いて低温の状態に保った。その結果、1回目と10回目では6時間程度経過しているにもかかわらず、ルチンの量はほとんど変わらなかった (Table 3)。このことから、70% メタノールを用いて室温で抽出されたルチンは、低温で保つことにより、経時変化はほとんどないと考えられる。

Table 3 The change of rutin with the passage of time

Injection No.	Quantity of rutin (mg/100g)
1	16.3
2	16.3
3	16.2
4	16.3
5	16.3
6	16.4
7	16.4
8	16.4
9	16.3
10	16.4
mean	16.3
S.D.	0.07
C.V. (%)	0.42

3. 5 各種試料からのルチンの抽出量

Table 4にそば粉5種及び小麦粉2種からのルチンの抽出量を示す。そば粉からのルチンの抽出量は、4.9–31.2 mg/100g と種類により大きく異なった。これは、そばの品種や精製の度合いの違いによるものと考える。

一方、小麦粉2種については、ルチンはいずれも含まれないことが分かった。

Table 4 Quantity of rutin extracted from buckwheat flour and wheat flour

Sample	Quantity of rutin (mg/100g)	
	Method I	Method II
Buckwheat - 1 (domestic)	16.3	16.1
Buckwheat - 2 (")	30.1	31.2
Buckwheat - 3 (imported)	4.9	4.9
Buckwheat - 4 (")	29.2	28.3
Buckwheat - 5 (")	26.2	25.5
Wheat - 1 (domestic)	N.D.	N.D.
Wheat - 2 (imported)	N.D.	N.D.

Method I : 80% methanol, 80°C, 60 min

Method II : 70% methanol, room temperature, 60 min

3. 6 そば粉と小麦粉からなる混合品の混合割合の定量

そば粉の割合が10–90%になるような混合品を調製し、その混合品からルチンを抽出し、その抽出量からそば粉の割合を算出した。その結果、80%メタノールを用いて80°Cで抽出を行った場合、ルチンの抽出量から算出したそば粉の割合は、実際の仕込値とほぼ一致しており、相関係数も0.9999と非常に良好な直線性を示した (Fig.12)。また、70%メタノールを用いて室温で抽出を行った場合も、ルチンの抽出量から算出したそば粉の割合は、実際の仕込値とよく近似しており、相関係数も0.9995と良好な直線性を示した (Fig.13)。

以上のことから、原料の提示があれば、そば粉と小麦粉からなる混合品に含まれるルチンの定量により、そば粉と小麦粉の混合割合を正確に定量できることが分かった。

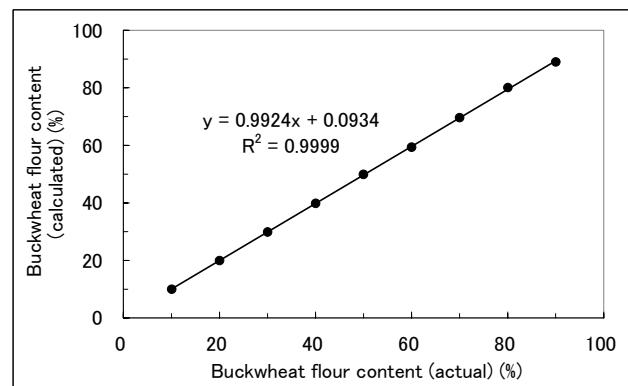


Fig.12 Relationship between actual buckwheat flour content and calculated buckwheat flour content in the case of the extraction by refluxing in a water bath controlled at 80°C with 80 % methanol for 60 min

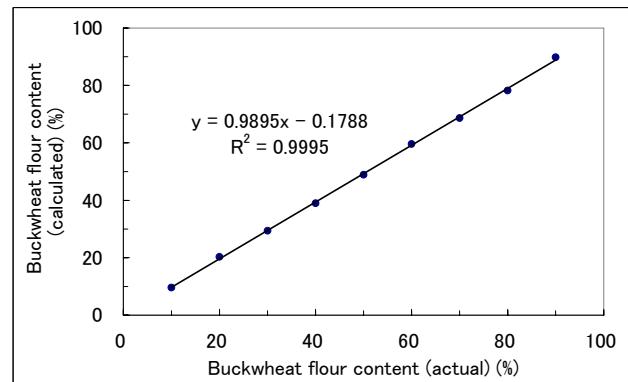


Fig.13 Relationship between actual buckwheat flour content and calculated buckwheat flour content in the case of the extraction by shaking at room temperature with 70% methanol for 60 min

4. 要 約

そば粉に特徴的に含まれるルチンに着目し, HPLC 法によるルチンの定量により, そば粉と小麦粉からなる混合品の混合割合の定量について検討を行った。

(1) ルチンは, $0.5-100 \mu \text{g/ml}$ の範囲で, 濃度とピーク面積の間で良好な直線関係が得られた。

- (2) そば粉中のルチンは, 80%メタノールを用いて, 80°Cで抽出を行うことにより, 安定して抽出できることが分かった。また, 70%メタノールを用いて, 室温で振とう抽出する方法も, ルチンの抽出法として有効であることが分かった。
- (3) 原料の提示があれば, ルチンの定量により, そば粉と小麦粉からなる混合品の混合割合を正確に定量できることが分かった。

文 献

- 1) 熊澤勉, 川端省三: 関税中央分析所報, **29**, 53 (1989).
- 2) 大村芳正, 市川亮一, 井内晃: 徳島県立工業技術センタ研究報告, **8**, 113 (1999).