

有色豆類中アントシアニンの分析

折田 綾音¹⁾ 船越 淳子²⁾ 武曾 歩³⁾ 山本 久美²⁾ 太田 英明³⁾

Analysis of Anthocyanins in Colored Beans

Ayane Orita¹⁾ Atsuko Funakoshi²⁾ Ayumi Musou³⁾ Kumi Yamamoto²⁾ Hideaki Ohta³⁾

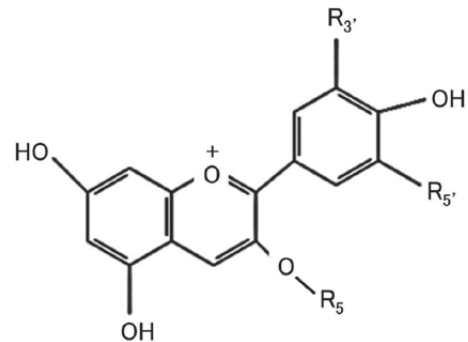
(2016年11月25日受理)

緒 言

一般的に豆とは植物分類学上のマメ科に属する穀物を指し、豆類は大きくササゲ属、インゲン属、ソラマメ属、エンドウ属、ダイズ属およびラッカセイ属の6種類に分かれている^[1]。ササゲ属には小豆やササゲ豆が、インゲン属には大正金時や大手亡豆が、ダイズ属には大豆や黒大豆が属している。近年、植物食品中の機能性についての研究が盛んに行われており、和食や和菓子でよく用いられる有色豆類にもポリフェノールが含まれるとの報告がある。

これまでに報告されている有色豆類中のポリフェノール成分として、クロロゲン酸やカフェ酸などのフェノール酸や^[2]フラボノイドの一種であるアントシアニン類が含まれると報告されている。フラボノイドは一般的に糖が結合した形(配糖体)で存在しており、高等植物に普遍的に含まれている。アントシアニン類は、他のフラボノイド類と比較するとアグリコンの種類や結合する糖や有機酸の種類も少ない。一方、豆類ポリフェノールの機能性として、肝保護作用、血糖値上昇抑制作用、肥満抑制作用、抗酸化作用が報告されている^[3-5]。図1には本研究で用いた9種類のアントシアニンの化学構造を示した。豆類に関する研究では、国内産の赤ササゲ豆種皮には Delphinidin-3-glucoside (Dp-3-glu), Cyanidin-3-glucoside (Cy-3-glu)^[6]、金時豆においては Pelargonidin 系色素^[7]の存在が報告されている。

国内における豆類の主要な産地は北海道であり、小豆では全国の作付面積の約8割を占めている^[8]。他方、沖縄県では、収穫量は多くないものの、「黒小豆」と呼ばれる黒色の種皮をもつササゲ豆が栽培されており、古くから十五夜や祝いごとの食素材として利用されてきた。主要な豆類の産地である北海道で栽培された小豆を用いて、抗酸化活性の評価を行った研究はあり^[3, 4]、その関連で小豆のアントシアニンに関係すると報告されている。一



アントシアニン (略号)	R _{3'}	R _{5'}	R ₅
Cyanidin-3-galactoside (Cy-3-gal)	OH	H	gal
Cyanidin-3-glucoside (Cy-3-glu)	OH	H	glu
Delphinidin-3-galactoside (Dp-3-gal)	OH	OH	gal
Delphinidin-3-glucoside (Dp-3-glu)	OH	OH	glu
Petunidin-3-galactoside (Pt-3-gal)	OH	OCH ₃	gal
Petunidin-3-glucoside (Pt-3-glu)	OH	OCH ₃	glu
Pelargonidin-3-glucoside (Pg-3-glu)	H	H	glu
Peonidin-3-glucoside (Pn-3-glu)	OCH ₃	H	glu
Malvidin-3-glucoside (Mv-3-glu)	OCH ₃	OCH ₃	glu

gal., galactose
glu., glucose

図1 本研究で用いたアントシアニンの化学構造

方、沖縄県産のササゲ豆およびインゲンマメを対象とした抗酸化活性およびアントシアニンに関する研究は少ない。さらに、1988年に国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センターにて開発され、現在福岡県朝倉郡筑前町で特産品として栽培されている黒大豆(クロダマル)^[9]については、総アントシアニン含量を報告した例^[10]はあるものの、構成するアントシアニンについての論文は見当たらない。

そこで本研究では、有色豆類の中で種皮が黒色である沖縄県産の黒ササゲおよびインゲンマメ、福岡県産黒大豆(クロダマル)3種類の主要アントシアニンの調査を行い、一応の成果を得たので報告する。

別刷請求先: 太田英明, 中村学園大学栄養科学部, 〒814-0198, 福岡市城南区別府5-7-1

E-mail: hohta@nakamura-u.ac.jp

1) 中村学園大学大学院栄養科学研究科

2) 中村学園大学短期大学部食物栄養学科

3) 中村学園大学栄養科学部

実験材料および方法

1. 実験材料および試薬

試料は、マメ科に属する、ササゲ属の黒ササゲ、インゲン属のインゲンマメ、ダイズ属の黒大豆（クロダマル）の3種類を使用した。黒ササゲ、インゲンマメは沖縄県産、黒大豆は福岡県産を用いた。

試料は凍結乾燥後、Labo Milser（岩谷産業株式会社製）を用いて粉碎し、実験に用いるまで -80°C で保存した。アントシアニンの標準物質である、Delphinidin-3-galactoside (Dp-3-gal), Dp-3-glu, Cyanidin-3-galactoside (Cy-3-gal), Cy-3-glu, Petunidin-3-galactoside (Pt-3-gal), Petunidin-3-glucoside (Pt-3-glu), Peonidin-3-glucoside (Pn-3-glu) および Malvidin-3-galactoside (Mv-3-gal) は常磐植物化学研究所製の HPLC 用試薬, Pelargonidin-3-glucoside (Pg-3-glu) は EXTRASYNTHESES 社製の HPLC 用試薬を使用した。アセトニトリル, メタノールは和光純薬製の HPLC 用試薬を, その他の試薬は同社の特級試薬を使用した。

2. アントシアニンの抽出

豆類など植物食品中のアントシアニンの抽出には様々な抽出溶媒が使用されている。吉倉ら^[11]は、黒大豆を対象とした研究において、1%塩酸-メタノール溶液を用いて抽出を行っている。1%塩酸-メタノール溶液は、ビルベリーアントシアニンの抽出にも用いられており、植物食品中のアントシアニン抽出によく使用される溶媒の1つである^[12]。

アントシアニンの抽出には、1%塩酸-メタノール溶液(1:37, v/v)を用いた。抽出は、試料(1.0 g)を褐色の硬質ガラス製遠沈管に移し、上記溶媒を8 mL添加後、攪拌した。30分間の超音波処理(15分で1回攪拌)を行い、 5°C で48時間放置し抽出した。その後、遠心分離(3500 rpm, 15分間)し、上清を回収する操作を3回繰り返した。得られた上清は25 mLに定容しアントシアニン抽出液とした。

3. アントシアニンの分析

アントシアニンの分析には島津製 HPLC を用いた(検出器は SPD-M20A, ポンプ LC-20AD, カラムオープン CTO-20A, オートインジェクター SIL-10AF, デガッサー DGU-20A₃)。カラムは Cadenza CD-C18 ($\phi 4.6 \times 250$ mm, $3 \mu\text{m}$, Imtakt) を使用し、カラム温度 40°C , 注入量 $10 \mu\text{L}$, 流速 0.6 mL/min , 測定波長 520 nm に設定した。移動相 A はギ酸:水(3:97, v/v), 移動相 B はギ酸:アセトニトリル:水(3:30:67, v/v)を用い、分析時間50分間, グラジエント条件25-50% B 液で分

析した。アントシアニン抽出液は、シリンジフィルター(孔径 $0.20 \mu\text{m}$, Advantec 製)でろ過し、HPLC 分析に供した。試料溶液中のアントシアニンの同定および定量には標準物質を1%塩酸-メタノール溶液(1:37, v/v)に溶解し、 0.1 mg/mL の濃度に調製したものをを用い、同定は保持時間との照合によって、また、定量は標準溶液とのピーク面積の比較で行った。

実験結果および考察

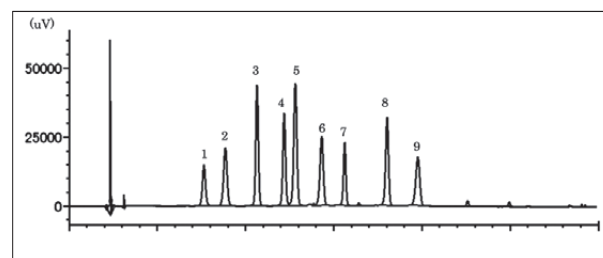
1. 主要アントシアニンの同定

本研究で標準物質として用いたアントシアニンの HPLC クロマトグラムを図2に示した。

分析の結果、Dp-3-gal は15.3分、Dp-3-glu は17.7分、Cy-3-gal は21.3分、Cy-3-glu は24.4分、Pt-3-gal は25.6分、Pt-3-glu は28.6分、Pg-3-glu は31.2分、Pn-3-glu は36.0分、Mv-3-glu は39.5分にそれぞれピークが検出された。

主要アントシアニンの同定では、先行研究よりササゲ豆および黒大豆の種皮に存在することが報告されている^[13]、Dp-3-glu, Cy-3-glu, Pt-3-glu および Mv-3-glu の計4種類のアントシアニンについて考察した。

供試した試料の分析結果を表1に示した。黒ササゲからは、Dp-3-glu, Cy-3-glu, Pt-3-glu および Mv-3-glu の



アントシアニン (略号)	保持時間 (分)
1 Delphinidin-3-galactoside (Dp-3-gal)	15.3
2 Delphinidin-3-glucoside (Dp-3-glu)	17.7
3 Cyanidin-3-galactoside (Cy-3-gal)	21.3
4 Cyanidin-3-glucoside (Cy-3-glu)	24.4
5 Petunidin-3-galactoside (Pt-3-gal)	25.6
6 Petunidin-3-glucoside (Pt-3-glu)	28.6
7 Pelargonidin-3-glucoside (Pg-3-glu)	31.2
8 Peonidin-3-glucoside (Pn-3-glu)	36.0
9 Malvidin-3-glucoside (Mv-3-glu)	39.5

図2 アントシアニン標準物質(9種類)のHPLCクロマトグラム

表1 アントシアニン含量

	Dp-3-glu (mg/g)	Cy-3-glu (mg/g)	Pt-3-glu (mg/g)	Mv-3-glu (mg/g)
黒ササゲ	0.52 ± 0.01	1.04 ± 0.03	0.45 ± 0.01	0.32 ± 0.00
インゲンマメ	0.38 ± 0.00	N.D.	0.18 ± 0.00	0.10 ± 0.00
黒大豆	0.08 ± 0.00	0.44 ± 0.01	0.02 ± 0.00	N.D.

means \pm S.D (n=3)
N.D., not detected.

4種類すべてのアントシアニンが検出された。含量はDp-3-gluが0.52 mg/g, Cy-3-gluが1.04 mg/g, Pt-3-gluが0.45 mg/g, Mv-3-gluが0.32 mg/gであり, Cy-3-gluが他の3種類と比較して2.0~3.3倍高値であった。このことから, 黒ササゲの主要なアントシアニンは, Cy-3-gluであると推察された。

インゲンマメからは, Dp-3-glu (0.38 mg/g), Pt-3-glu (0.18 mg/g) および Mv-3-glu (0.10 mg/g) が検出された。インゲンマメでは, Dp-3-glu が Pt-3-glu の2.1倍, Mv-3-glu の3.8倍と高い値を示し, Dp-3-glu, Pt-3-glu, Mv-3-glu 以外に大きなピークは検出されなかったことから, インゲンマメの主要なアントシアニンは Dp-3-glu であると考えられた。

黒大豆においては, Dp-3-glu (0.08 mg/g), Cy-3-glu (0.44 mg/g), Pt-3-glu (0.02 mg/g) が検出された。黒大豆では, Cy-3-gluがDp-3-gluの5.5倍, Pt-3-gluの22.0倍と有意に高い含量であった。このことから, 黒大豆の主要なアントシアニンは Cy-3-glu であると推察された。また, 先行研究においても黒大豆中には Dp-3-glu, Cy-3-glu, Pt-3-glu が含まれていることが報告されており^[13], 本研究の分析結果も先行研究と一致するものであった。

本研究で標準物質として用いた Dp-3-glu, Cy-3-glu, Pt-3-glu および Mv-3-glu の4種類のアントシアニン以外に, 黒ササゲでは4本, インゲンマメでは2本のピーク

が検出された(図3)。インゲンマメから検出された2本のピークは, 黒ササゲから検出されたP1およびP3のピークと保持時間がほぼ一致したため, 同じ物質であると考えられた。標準物質の保持時間と一致しなかったピークについてさらに, 検討を加えた。

2. 微量アントシアニンの同定

主要なアントシアニンの同定では検討を行わなかった Dp-3-gal, Cy-3-gal, Pt-3-gal, Pg-3-glu および Pn-3-glu 5種類に Dp-3-glu, Cy-3-glu, Pt-3-glu, Mv-3-glu を混合した9種類のアントシアニンについて考察を行った。

黒ササゲおよびインゲンマメから検出された物質P1~P4の保持時間を Dp-3-gal, Cy-3-gal, Pt-3-gal, Pg-3-glu および Pn-3-glu の保持時間と比較した。その結果, 黒ササゲおよびインゲンマメから検出されたP1は Dp-3-gal, P3は Pt-3-gal, 黒ササゲからのみ検出されたP2は Cy-3-gal, P4は Pn-3-glu の保持時間と一致した。

本研究では, 黒ササゲからは, Dp-3-glu, Cy-3-glu, Pt-3-glu, Mv-3-glu 以外に, Dp-3-gal, Cy-3-gal, Pt-3-gal および Pn-3-glu の4種類のアントシアニンが微量検出された。外国産黒ササゲを用いた先行研究では, Dp-3-gal, Dp-3-glu, Cy-3-gal, Cy-3-glu, Pg-3-glu および Pt-3-glu が含まれるとの報告があり^[14], 本研究の分析結果もほぼ先行研究と一致するものであった。しかしながら, 先行研究で検出された Pg-3-glu は本研究で供試した沖縄県産黒ササゲからは検出されなかった。

インゲンマメからは, Dp-3-gal, Dp-3-glu, Pt-3-gal, Pt-3-glu および Mv-3-glu の5種類が, 黒大豆からは, Dp-3-glu, Cy-3-glu および Pt-3-glu の3種類が検出された。

要 約

本研究では, 沖縄県産の黒ササゲおよびインゲンマメ, 福岡県産黒大豆(クロダマル) 3種類の主要アントシアニンの調査を行った。その結果, 最も含量が多いアントシアニンは Cy-3-glu であり黒ササゲでは1.04 mg/g, 黒大豆では0.44 mg/gであった。インゲンマメでは Dp-3-glu が0.38 mg/gで最も高値であった。以上より, 黒ササゲおよび黒大豆の主要アントシアニンは Cy-3-glu, インゲンマメは Dp-3-glu であると推察された。

文 献

- [1] 相馬暁, 浅田峰子, 石川幸彦, 神山久夫, 菊池幸, 重野哲寛, 高嶋敏美, 藪生, 吉田企世子, 21世紀の健康づくり 豆類百科, 財団法人 日本豆類基金協会, 47-44 (2008).
- [2] Muhammad, Z, U, H., Shakeel, A., Ryszard, A., Vincenzo, D, F., Antioxidant Activity of the Extracts of Some Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) Cultivars Commonly Consumed

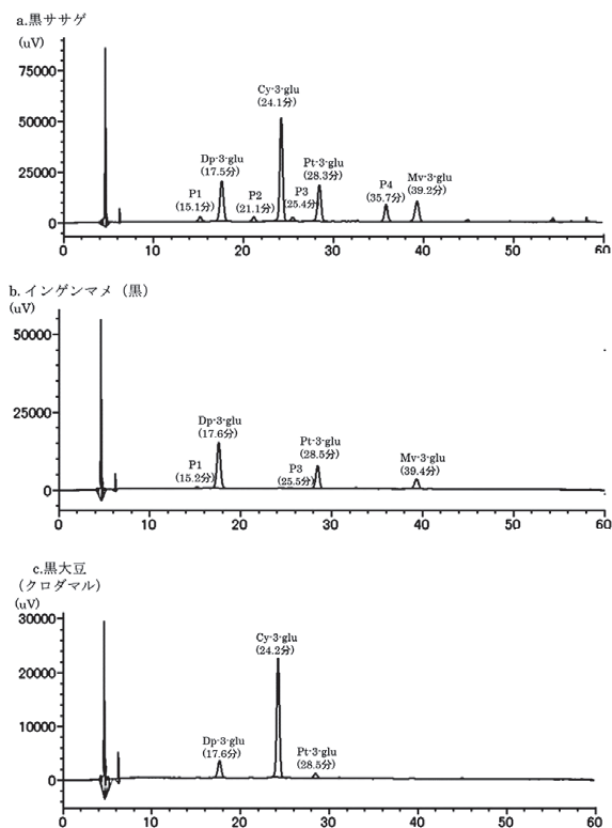


図3 試料のHPLCクロマトグラム
a, c; 希釈倍率2倍, b; 希釈なし

- in Pakistan., *Molecules.*, **18**, 2005-2017 (2013).
- [3] 小嶋道之, 山下慎司, 西繁典, 齋藤優介, 前田龍一郎, 小豆ポリフェノールの生体内抗酸化活性と肝臓保護作用, *日本食品科学工学会誌*, **57** (7), 386-392 (2006).
- [4] 齋藤優介, 西繁典, 小嶋浩, 弘中和憲, 小嶋道之, 豆類ポリフェノールの抗酸化活性ならびに α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ阻害活性, *日本食品科学工学会誌*, **54** (12), 563-567 (2007).
- [5] 小嶋道之, 西繁典, 齋藤優介, 弘中和憲, 小嶋浩, 前田龍一郎, 小豆ポリフェノールの単回および継続投与が血中グルコース濃度に及ぼす影響, *日本食品科学工学会誌*, **54** (1), 50-53 (2007).
- [6] 比護和子, 村上智子, 林一也, 寺原典彦, 津久井亜紀夫, ササゲ種皮とササゲ煮汁液のアントシアニン色素の同定とササゲ煮汁の色調について, *日本食品保蔵科学会誌*, **29** (3), 159-163 (2003).
- [7] 吉倉和子, 浜口陽一, 金時豆のアントシアニン色素, *栄養と食糧*, **24** (5), 275-278 (1971).
- [8] 農林水産省HP, http://www.maff.go.jp/j/pr/aff/1012/spe1_02.html
- [9] 中澤芳則, 高橋将一, 小松邦彦, 松永亮一, 羽鹿牧太, 酒井真次, 異儀田和典, ダイズ新品種「クロダマル」の育成とその特性, *九州沖縄農業研究センター報告*, **48**, 11-30 (2007).
- [10] 澤井祐典, 菅原晃美, 沖智之, 西場洋一, 氏原邦博, 須田郁夫, 紫黒米・黒大豆のアントシアニン分析における高速液体クロマトグラフィーとpH differential法の比較, *日本分析化学会誌*, **59** (2), 104-108 (2012).
- [11] 吉倉和子, 浜口陽一, 黒大豆のアントシアニン色素, *栄養と食糧*, **22** (6), 15-18 (1969).
- [12] 石川ふさ子, 大石充男, 新藤哲也, 堀江正男, 安井明子, 中里光男, ブルーベリーエキスに含有する健康食品中のアントシアニンの分析, **49** (5), 339-346 (2008).
- [13] Choung, M, G., Baek I, Y., Kang S, T., Han W, Y., Shin D, C., Moon H, P., Kang K, H., Isolation and anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5848-5851 (2001).
- [14] Ojwang, O, L., Dykes, L., Awika, M, J., Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry Profiling of Anthocyanins and Flavonols in Cowpea (*Vigna unguiculata*) of Varying Genotypes, *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 3735-3744 (2012).