紫かんしょのアシル化アントシアニン由来 6-O-Caffeoylsophorose の大量調製法

福井敬一[§], 松ヶ野一郷, 杉田浩一, 寺原典彦*,
松井利郎**, 松本 清**

社団法人宮崎県 JA 食品開発研究所

* 南九州大学健康栄養学部食品健康学科

** 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門

Large-scale Preparation of 6-O-Caffeoylsophorose from Acylated Anthocyanins in Purple Sweet Potato

Keiichi Fukui[§], Kazusato Matsugano, Kouichi Sugita, Norihiko Terahara*,
Toshiro Matsui** and Kiyoshi Matsumoto**

Miyazaki JA Food Research and Development Inc., 3-2-2 Ikimedai-nishi, Miyazaki 880-0943

* Department of Food Science for Health, Faculty of Health and Nutrition,
Minami-Kyushu University, 5-1-2 Kirishima, Miyazaki 880-0032

** Division of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School
Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

6-O-caffeoylsophorose(CS) is a functional component of vinegar produced by the acetic fermentation of storage roots of purple sweet potato (cultivar Ayamurasaki). Large-scale preparation of CS was examined using a synthetic absorbent resin, Diaion HP20. The CS-rich preparation produced by heat cleavage in acidic conditions from purple sweet potato pigment (PSP) was purified by the HP20 open column method. However, a high purity of CS was not achieved due to the co-elution of chlorogenic acid. To remove the interfering chlorogenic acid, PSP was applied to the column and eluted with 15% ethanol, resulting in the elution of chlorogenic acid while the anthocyanins were absorbed to the resin. We were thus able to obtain chlorogenic acid-free PSP (CF-PSP) with a recovery ratio of approximately 66%. As a result of the purification of CS from heat-treated CF-PSP, we obtained CS with a purity of 80% at a recovery ratio of approximately 12%.
(Received Jun. 30, 2005 ; Accepted Jan. 5, 2006)

紫かんしょ品種「アヤマラサキ」は、アントシアニン色素を多量に含み、様々な食品の原料に利用されている。我々は、アヤマラサキを酢酸発酵させた鮮明な赤色の醸造酢「紅酢」を開発した¹⁾。紅酢は高い抗脂質過酸化能やDPPHラジカル消去能などの機能性を持つことが判明し²⁾、その機能性成分の一つは紫かんしょ由来のアシル化アントシアニン類³⁾であった。また、紅酢中に新たに見出した成分6-O-Caffeoylsophorose (CS)⁴⁾が α -グルコシダーゼ阻害活性を持ち、ラットを用いた試験においても食後血糖値上昇抑制活性が認められ、優れた抗糖尿病活性成分であることを明らかにしてきた⁵⁾。CSは、紫かんしょ

「アヤマラサキ」に見られる約20種類のアントシアニンの中、主要なアシル化アントシアニンの一つであるYGM-5b⁶⁾の側鎖フラグメントであり(図1)、紫かんしょ色素を弱酸性下で加熱することで効率的に産生できることを明らかにしている⁷⁾。一方、人を対象とした臨床試験に用いるには純度の高いCSが大量に必要なってくる。CSの製造法に関して分取HPLC法はコストがかかり実用的ではない。また工業用の吸着樹脂とオープンカラムではCSの溶出とクロロゲン酸の溶出が重なり純度を上げることが困難であった。

本研究では、上記のカラムクロマトグラフィーを用いて、紫かんしょ色素からクロロゲン酸を除去する方法、及びその色素を用いて高純度のCSを大量に調製する方法を確立したので報告する。

〒880-0943 宮崎県宮崎市生目台西 3-2-2

* 〒880-0032 宮崎県宮崎市霧島 5-1-2

** 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), fukui_kei@kei.mz-ja.or.jp

YGM	骨 格
1a	R ₁ =H, R ₂ =カフェ酸, R ₃ = <i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸
1b	R ₁ =H, R ₂ =カフェ酸, R ₃ =カフェ酸
2	R ₁ =H, R ₂ =カフェ酸, R ₃ =H
3	R ₁ =H, R ₂ =カフェ酸, R ₃ =フェルラ酸
4b	R ₁ =CH ₃ , R ₂ =カフェ酸, R ₃ =カフェ酸
5a	R ₁ =CH ₃ , R ₂ =カフェ酸, R ₃ = <i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸
5b	R ₁ =CH ₃ , R ₂ =カフェ酸, R ₃ =H
6	R ₁ =CH ₃ , R ₂ =カフェ酸, R ₃ =フェルラ酸

図 1 紫かんしょ「アヤマラサキ」に含まれる主要なアントシアニンと 6-O-Caffeoylsophorose の構造図

実 験 方 法

1. 試 料

紫かんしょ色素 (PSP) は、宮崎県を中心として栽培された紫かんしょ「アヤマラサキ」から、吸着樹脂を用いて精製した紫かんしょエキス R-MH40 (日農化学製) を用いた。合成吸着樹脂には、各種ポリフェノール類の精製に多数の応用例⁸⁾があり、赤キャベツ色素 (アントシアニン系) の工業規模の抽出⁹⁾にも使用されているダイヤイオン HP 20 (三菱化学製、芳香族系合成吸着樹脂、比表面積約 600 m²/g、細孔半径 20~30 nm) を用いた。

2. CS 混液の調製

既報⁷⁾に従い、PSP の 1.0% 酢酸水溶液をレトルト用パウチに充填して密封し、レトルト殺菌器 Flavor Ace 40 RTGN (日阪製作所製) を用いて 120℃ で 2 時間加熱して CS を生成させ、CS 混液とした。

3. カラム精製

長さ 100 cm、内径 104 mm のガラス製円筒形オープンカラムを用いた。ダイヤイオン HP20 樹脂を脱イオン水に流動させてカラムに充填し、静置して自然沈降させた時の樹脂の長さが 80 cm となるように吸着樹脂の量 (約 6.8 L) を調整した。流量は、空間速度 SV=約 1.5 (約 10 L/hr) となるように調整した。精製操作は、まず、吸着樹脂を充填後 95% エタノールで洗浄し、1.0% 酢酸水溶液 5 L を通液して平衡化させた。CS 混液の試料を通液して成分を吸着させた後、15% エタノールの溶離液に変えて展開させ、溶出液を 1 L のフラクションに分画し、HPLC を用いて成分を測定した。

4. HPLC 分析条件

試料を 1% トリフルオロ酢酸水溶液で適宜希釈した後、0.45 μm フィルターでろ過して HPLC 分析に供した。HPLC 分析は Terahara らの方法⁴⁾に準じ、以下の方法で行った。

分析システム：島津 LC-10 (ポンプ：LC-10AD, 検出器：SPD-10AV), カラム：GL Science Inertsil ODS-3 (4.6×250 mm), 流速：1.0 ml/min, 温度：30℃, 試料量：10 μl

A 液：0.4% ギ酸, B 液：0.4% ギ酸-50% アセトニトリル, B 液 20%→45% (50 min, リニアグラジエント)

または、上記の条件の一部を、カラム：Imtakt Cadenza CD-18 (4.6×250 mm), 流速：0.6 ml/min, B 液：25%→50% に変えて測定した。

CS とクロロゲン酸は、310 nm で検出した。CS は、分取 HPLC 法⁴⁾によって得た CS 画分を標準物質とし、クロロゲン酸は、Chlorogenic acid (フナコシ(株)) を標準物質としてピーク面積から濃度を算出した。また、310 nm で検出した CS とクロロゲン酸以外の全てのピークは、面積を集計して UV 吸収を示す成分の総量 (総 UV 成分) とし、クロロゲン酸相当量に換算した。アントシアニン類は、520 nm で検出した。また、ピークの全ての面積を集計してアントシアニン類の総量 (総アントシアニン類) とし、Cyanidin-3-glucoside (Cy 3-G) 相当量に換算した。

結果および考察

1. クロロゲン酸の除去方法の検討

PSP を元にして調製した CS 混液から、溶離液のエタノール濃度を調整して成分を展開させるカラムクロマトグ

図 2 PSP のカラムクロマトグラム

▲: クロロゲン酸, ■: 総 UV 成分, ◆: 総アントシアニン類

ラフィーによって, CS を精製することを試みた. その結果, CS と同時にクロロゲン酸を主とした不要な成分が溶出するため, CS の純度を上げることは困難であると考えられた. クロロゲン酸の同時溶出は, 溶離液のエタノール濃度を調整しても有効に分離することは出来なかった. しかし, クロロゲン酸は, CS と同時に溶離初期に溶出するため, 比較的後期に溶出するアントシアニン類とはエタノール濃度を調整することによって分離出来る可能性が示された.

そこで, PSP からクロロゲン酸を除去し, CS の起源となるアントシアニン類と分離することを検討した. PSP 300 g を脱イオン水 10 L に溶解してカラムに吸着させ, 溶離液のエタノール濃度を検討したところ, 20% 以上ではクロロゲン酸の溶出が終わらないうちにアントシアニン類が多量に溶出したため, 15% エタノールに変えて展開させた. 図 2 に示したように, クロロゲン酸は溶離初期から溶出し, フラクション No. 41 まででほぼ全てが溶出した. 一方, 総アントシアニン類は, 溶離初期に溶出があったが, 含有量の少ない, 非アシル化アントシアニンである YGM-0a (シアニジン 3-ソホロシド-5 グルコシド) や -0b (ペオニジン 3-ソホロシド-5 グルコシド) であった. その他のアントシアニン類はカラムへ吸着されたままでほとんど溶出せず, フラクション No. 51 までにおいて溶出量はわずかであった.

また, 総 UV 成分は, 溶離初期から溶出が見られ, 一旦減少した後フラクション No. 41 から再度増加した. 総 UV 成分は, フラクション No. 51 においても溶出しているが, このフラクションに含まれる成分は, 溶出時間から判断して CS とは同時に溶出しない成分であると考えられた.

従って, 15% エタノールを溶離液に用いることでクロロゲン酸を主とする不要な成分のほぼ全てを除去し, アントシアニン類と分離できることが明らかとなった. この後,

図 3 PSP と CF-PSP の HPLC クロマトグラム (310 nm 検出)

●: アシル化アントシアニンのピーク

95% エタノールを用いてカラムに残った全ての成分を溶出させて回収し, エバポレーターで濃縮して真空凍結乾燥し, クロロゲン酸フリー紫かんしょ色素 (CF-PSP) とした. 試料とした PSP 300 g の乾燥重量 (129.9 g) に対し, 約 66% の収率 (85.3 g) であった. 図 3 に PSP と CF-PSP の HPLC クロマトグラムを示した. アシル化アントシアニンのピークパターンは両者でほぼ同様であるが, CF-PSP はクロロゲン酸とその周辺のピークが完全に取り除かれており, クロロゲン酸が除去された PSP であることが確認された.

2. クロロゲン酸フリー紫かんしょ色素からの CS 調製

PSP 300 g から得た CF-PSP を 1.0% 酢酸水溶液 10 L に溶解し, 前記の方法で加熱してクロロゲン酸フリー CS 混液 (CF-CS 混液) を調製した. これをカラムに吸着させ, 溶離液に 15% エタノールを用いて溶出し, 1 L ごとのフラクションを集めた. 尚, フラクション No. 9 から 18 まで及び No. 19 から 28 までの 2 区分は 1 つのフラクションにまとめて 10 L とし, HPLC 分析を行った. 図 4 に示したように, CS は溶離初期から溶出し, フラクション No. 29 まででほぼ全てが溶出した. この間, クロロゲン酸の溶出はわずかであった. また, 総アントシアニン類及び総 UV 成分も樹脂に吸着されたままで, 溶出はわずかであった. フラクション No. 3 から No. 18 までを集めてエバポレーターで濃縮し, 真空凍結乾燥して精製 CS とした. 試料とした PSP 300 g の乾燥重量 (129.9 g) に対し約 12% の収率 (15.4 g) であった. 図 5 に CF-CS 混液と精製 CS の HPLC クロマトグラムを示した (CS はアノマー分離を起こすため 2 本のピークを示している). 精製 CS 中には不純物がわずかに認められるが, CF-CS 混液から CS を高純度に精製していることが確認された. 精製純度は, 分取 HPLC 法によって調製した CS 画分を 100% 標準として約 80% であった.

図 4 CF-CS 混液のカラムクロマトグラム

● : CS, ▲ : クロロゲン酸, ■ : 総 UV 成分, ◆ : 総アントシアニン類

要 約

工業用の合成吸着樹脂 HP20 とオープンカラムを用いて純度の高い 6-*O*-Caffeoylsophorose (CS) の精製方法を検討した。紫かんしょ色素 (PSP) を弱酸性加熱分解して調製した CS 混液からカラムクロマトグラフィーで CS を分離・精製すると、PSP 由来のクロロゲン酸等が CS と同時に溶出し、純度を上げることは困難であった。従って、PSP からクロロゲン酸を除去する方法、及びその色素を用いて高純度の CS を調製する方法を検討した。

(1) カラムに吸着させた PSP を 15% エタノールで展開すると、アントシアニン類は樹脂に吸着されたままでクロロゲン酸等が溶出され、クロロゲン酸を含まない PSP (CF-PSP) が 66% の収率で得られた。

(2) CF-PSP を弱酸性加熱分解して CS 混液を調製し、これをダイヤイオン HP20 樹脂カラムに吸着させ、15% エタノールで展開すると、不純物の少ない CS が 12% の収率で得られた。分取 HPLC 法によって調製した CS 画分を 100% 標準として、得られた CS の純度は約 80% であった。

文 献

- 1) 杉田浩一, 小池佳世, 福井敬一, 赤色の食酢の製造方法, 特開平 10-248551 (1998.9.22).
- 2) Terahara, N. and Sugita, K. High antioxidative activity

図 5 CF-CS 混液と精製 CS の HPLC クロマトグラム (310 nm 検出)

(CS は 2 ピークのアノマー化した異性体を示す)

of red vinegar produced by fermentation with purple sweet potato. The Fourth International Congress & Symposium on Natural Colorants 2000 INF/COL 2000 (2-5 April 2000, San Diego, California, U.S.A.), Papers pp. 354-364.

- 3) Terahara, N., Kato, Y., Nakamura, M., Maitani, T., Yamaguchi, M. and Goda, Y. Six diacylated anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cv Yamagawamurasaki, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1420-1424 (1999).
 - 4) Terahara, N., Matsui, T., Fukui, K., Matsugano, K., Sugita, K. and Matsumoto, K., Caffeoylsophorose in red vinegar produced through fermentation with purple sweet potato. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2539-2543 (2003).
 - 5) Matsui, T., Ebuchi, S., Fukui, K., Matsugano, K., Terahara, N. and Matsumoto, K., Caffeoylsophorose, a New Natural α -Glucosidase inhibitor, from Red Vinegar by Fermented Purple-Fleshed Sweet Potato. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68** (11), 2239-2246 (2004).
 - 6) 津久井亜紀夫, 鈴木敦子, 小巻克己, 寺原典彦, 山川 理, 林 一也, さつまいもアントシアニン色素の組成と安定性, *食科工*, **46**, 148-154 (1999).
 - 7) 福井敬一, 松ヶ野一郷, 寺原典彦, 松井利郎, 松本 清, 紫かんしょ由来アシル化アントシアニンの弱酸性加水分解による 6-*O*-Caffeoylsophorose の生成, *食科工*, **52**, 306-310 (2005).
 - 8) 足立 正, 合成吸着剤「ダイヤイオン」「セパビーズ」とその特性, *JETI*, **51** (11), 210-213 (2003).
 - 9) 三木和保, 真野 寛, 赤キャベツ色素の製造方法, 特開平 9-255888 (1997.9.30).
- (平成 17 年 6 月 30 日受付, 平成 18 年 1 月 5 日受理)