国産黒大豆中の総アントシアニンと 総プロアントシアニジンの定量

沖 智之^{1*}, 古川(佐藤)麻紀¹, 山下南穂², 白土英樹²,
後藤一寿¹, 奥野成倫¹, 須田郁夫¹

¹ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
九州沖縄農業研究センター

² 熊本県立大学環境共生学部

Determination of Total Anthocyanin and Proanthocyanidin
Contents in Black Soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.)
Cultivated in Japan

Tomoyuki Oki^{1*}, Maki Sato-Furukawa¹, Naho Yamashita²,
Hideki Shiratsuchi², Kazuhisa Goto¹,
Shigenori Okuno¹ and Ikuo Suda¹

¹ Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, National
Agriculture and Food Research Organization,
2421, Suya, Koshi, Kumamoto 861-1192

² Division of Food and Health Environment, Faculty of
Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural
University of Kumamoto, 3-1-100 Tsukide,
Kumamoto 862-8502

One hundred sixteen samples of black soybeans were collected from various areas of Japan, including Hokkaido, Honshu and Kyushu, between 2010 and 2012. Total anthocyanin and proanthocyanidin contents were determined by the pH differential and 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) methods, respectively. Total anthocyanin content ranged from 0.25 to 1.40 mg/g as cyanidin-3-glucoside equivalents, with a mean value of 0.90 mg/g. Proanthocyanidin content ranged from 0.23 to 1.52 mg/g as (+)-catechin equivalents, with a mean value of 0.93 mg/g. A weak negative correlation was observed between black soybean weight and total proanthocyanidin content ($n=116$, $r_s=-0.332$, $P<0.01$), while no correlation was found between black soybean weight and total anthocyanin content ($n=116$, $P=0.18$). Total anthocyanin content of black soybean was highly positively correlated with total proanthocyanidin content ($r=0.739$, $P<0.01$).

(Received Apr. 23, 2013; Accepted Jul. 1, 2013)

Keywords : black soybean, total anthocyanin, total proanthocyanidin, pH differential method, DMAC method

キーワード : 黒大豆, 総アントシアニン, 総プロアントシアニン, pH differential 法, DMAC 法

黒大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) は「中薬大辞典」などいくつかの書物に漢方薬として記載されており, その種

皮は「黒豆衣」と呼ばれ生薬として利用されてきた¹⁾。黒大豆の種皮には黒色素本体であるアントシアニンの他にプロアントシアニジン²⁾が含まれており, これら成分が健康の維持と増進にかかわる様々な機能性³⁾⁴⁾を発現することが明らかになるにつれ, 機能性食品素材として注目を浴びるようになっている。

一方でアントシアニンやプロアントシアニジンをはじめとする機能性成分の分析法については, 標準化された分析法がほとんど存在しないのが現状であり, 黒大豆中のこれら成分の存在量についての情報^{5)~7)}も限定的であり, また相互比較も困難な状況であった。そのため, 著者らはこれまでに黒大豆中の総アントシアニン分析法について比較検討を行い, 代表的な分析法である塩酸メタノール溶液中での還流を用いた方法⁸⁾では, 黒大豆に含まれるプロアントシアニジンからも還流中にアントシアニジンが生成するので, アントシアニン含量を過剰に見積もることが判明したため, 本法は黒大豆には不適であると判断した。一方, pH differential 法では上記の問題がないことから, 標準化する分析法の候補に選定し, pH differential 法の改良を行った後, 試験所間比較により妥当性を確認した⁹⁾。総プロアントシアニジン分析法については, 広く用いられている Folin-Ciocalteu 法¹⁰⁾, バニリン硫酸法¹¹⁾, 酸性ブタノールを用いた方法¹²⁾, 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) 法¹³⁾の中から特異性が高く, 黒大豆において共存するアントシアニンが測定値に影響を与えない DMAC 法を黒大豆の分析に適用して, 単一試験室において妥当性の確認¹⁴⁾を行い, 分析法の標準化を試みてきた。

そこで本研究では, 国内で栽培されている黒大豆のアントシアニンとプロアントシアニジンの含量を調べるため, 九州沖縄農業研究センターが育成した暖地向けの黒大豆品種「クロダマル」¹⁵⁾に加えて, 国内の各地で収穫された黒大豆を入手し, これら成分の変動や相関について実態を明らかにするとともに, 百粒重との関係について検討を加えた。

1. 実験方法

(1) 試料

黒大豆は 2010 年度から 2012 年度に収穫された, それぞれ 28 検体, 34 検体, 54 検体の合計 116 検体を用いた。試料の入手方法の大半は店頭や国内インターネットサイトでの購入であり, その他は生産者や九州沖縄農業研究センター・大豆育種研究グループからの提供であった。店頭やインターネットサイトで購入する場合は, 少なくとも産地が記載されている黒大豆を選択した。品種・銘柄と検体数は「クロダマル」が 32 検体, 「丹波黒」が 30 検体, 「光黒」が 20 検体, 「祝黒」が 5 検体, 「黒千石」が 5 検体, 「雁喰い豆」が 2 検体, 「くろさやか」が 2 検体, 「黒平豆」が 2 検体, 不明が 18 検体であり, それら品種・銘柄の産地は表 1 に示したとおりであった。黒大豆は全粒 (50 粒以上) をミルサー[®] (IFM-700G, 岩谷産業) で粉碎し, 分析用の試料と

¹ 〒861-1192 熊本県合志市須屋 2421

² 〒862-8502 熊本県熊本市東区月出 3-1-100

* 連絡先 (Corresponding author), tomooki@affrc.go.jp

表 1 収集した黒大豆の品種・銘柄、産地および検体数

品種・銘柄	検体数	産地							
クロダマル	32	福岡県	(3)	佐賀県	(1)	大分県	(18)	熊本県	(10)
丹波黒	30	滋賀県	(5)	兵庫県	(18)	岡山県	(5)	熊本県	(2)
光黒	20	北海道	(20)						
祝黒	5	北海道	(5)						
黒千石	5	北海道	(5)						
雁喰い豆	2	岩手県	(2)						
くろさやか	2	熊本県	(2)						
黒平豆	2	岩手県	(1)	宮城県	(1)				
不明	18	北海道	(14)	岡山県	(1)	佐賀県	(2)	熊本県	(1)

産地（都道府県）名の右括弧内の数字は収集した検体数を表す。

図 1 国産黒大豆の総アントシアニン量

箱ひげ図において、箱の下端はデータの第1四分位数、上端は第3四分位数を表し、箱の中の線は中央値を示す。ひげの両端は、それぞれ最小値と最大値を表す。×印は平均値を示す。5検体以上が収集できた品種・銘柄での平均値の多重比較検定は Scheffe 法で行った。

した。

(2) 総アントシアニン量の測定

既報⁹⁾に従い、粉碎した試料（約1g）からアントシアニン用抽出溶媒（メタノール：水：トリフルオロ酢酸＝40：60：0.5）を用いて試料溶液を調製した後、試料溶液中の総アントシアニン量を pH differential 法で測定した。黒大豆中の総アントシアニン量はシアニジン-3-グルコシド相当（Cy3GE）として、黒大豆1gあたりで算出した。なお、1検体につき試料溶液の調製から測定までを2反復で行った。

(3) 総プロアントシアニジン量の測定

既報¹⁴⁾に従い、粉碎した試料（約1g）からプロアントシアニジン用抽出溶媒（アセトン：水：酢酸＝70：29.5：0.5）を用いて試料溶液を調製した後、試料溶液中の総プロアントシアニジン量を DMAC 法で測定した。黒大豆中の総プロアントシアニジン量は（+）-カテキン相当（CE）として、黒大豆1gあたりで算出した。なお、1検体につき試料

溶液の調製から測定までを2反復で行った。

(4) 統計解析

Scheffe 法による多重比較、正規性の検定（コルモゴロフ・スミルノフ検定）およびスピアマンの順位相関係数の算出は、Excel（Microsoft 社）のアドインソフトであるエクセル統計 2008（社会情報サービス社）で行い、その他の統計処理は Excel 2007（Microsoft 社）の関数および解析ツールで行った。

2. 実験結果

(1) 黒大豆中の総アントシアニン量

本研究で収集した黒大豆中の総アントシアニン量の分布を図1に示した。最小値と最大値はそれぞれ 0.25mg-Cy3GE/g と 1.40mg-Cy3GE/g であり、全試料の平均値は 0.90mg-Cy3GE/g であった。品種・銘柄別の平均値は「クロダマル」「丹波黒」「光黒」「祝黒」「黒千石」「雁喰い豆」「くろさやか」ならびに「黒平豆」で、それぞれ 1.17, 0.76,

図 2 国産黒大豆の総プロアントシアニジン量

箱ひげ図において、箱の下端はデータの第1四分位数、上端は第3四分位数を表し、箱の中の線は中央値を示す。ひげの両端は、それぞれ最小値と最大値を表す。×印は平均値を示す。5検体以上が収集できた品種・銘柄での平均値の多重比較検定はScheffe法で行った。

図 3 黒大豆の百粒重と総アントシアニン量 (A) もしくは総プロアントシアニジン量 (B) との散布図

○, 「クロダマル」; △, 「丹波黒」; □, 「光黒」; ◇, その他。

その他には「祝黒」「黒千石」「雁喰い豆」「くろさやか」「黒平豆」および品種・銘柄が不明な黒大豆が含まれる。

0.79, 0.89, 0.79, 0.84, 0.86, 0.86mg-Cy3GE/gであった。5検体以上が収集できた5品種・銘柄について、平均値をScheffe法により検定した結果、有意水準5%で「クロダマル」が「丹波黒」「光黒」および「黒千石」との間で有意差を示した(図1)。

(2) 黒大豆中の総プロアントシアニジン量

本研究で収集した黒大豆中の総プロアントシアニジン量の分布を図2に示した。最小値と最大値はそれぞれ0.23mg-CE/gと1.52mg-CE/gであり、全ての黒大豆での平均値は0.93mg-CE/gであった。品種・銘柄別の平均値は「ク

ロダマル」「丹波黒」「光黒」「祝黒」「黒千石」「雁喰い豆」「くろさやか」ならびに「黒平豆」で、それぞれ1.07, 0.76, 0.88, 1.06, 1.20, 0.99, 1.20, 0.82mg-CE/gであった。5検体以上が収集できた5品種・銘柄について、平均値をScheffe法により検定した結果、有意水準5%で「丹波黒」が「クロダマル」および「黒千石」との間で有意差を示した(図2)。

(3) 黒大豆の百粒重と機能性成分量との関係

黒大豆百粒重と総アントシアニン量もしくは総プロアントシアニジン量との散布図を、それぞれ図3(A)と図3(B)に示した。百粒重がコルモゴロフ・スミルノフ検定で正規

図4 黒大豆の総アントシアニン量と総プロアントシアニジン量との散布図

分布していないと判断されたため、スピアマンの順位相関係数を求めた。百粒重と総アントシアニン量の相関は、全ての黒大豆では $r_s = -0.128$ (有意確率 $P=0.18$) であり、20 検体以上が収集できた「クロダマル」「丹波黒」ならびに「光黒」では、それぞれ $r_s = -0.378$ ($P=0.03$)、 -0.717 ($P<0.01$)、 0.327 ($P=0.16$) であった。百粒重と総プロアントシアニジン量の相関は、全ての黒大豆では $r_s = -0.332$ ($P<0.01$) であり、「クロダマル」「丹波黒」ならびに「光黒」では、それぞれ $r_s = -0.218$ ($P=0.23$)、 -0.481 ($P<0.01$)、 0.313 ($P=0.18$) であった。

(4) 黒大豆中の各機能性成分の相関

黒大豆 116 検体の総アントシアニン量と総プロアントシアニジン量とのピアソンの積率相関係数は $r=0.739$ ($P<0.01$) であり、強い正の相関が認められた (図4)。

3. 考察

黒大豆は近年、機能性食品素材として注目を浴びているが、黒大豆中の含量についての情報は、標準化された分析法がないこともあり限定的であった。そこで本研究では、それぞれ試験所間比較と単一試験室で妥当性が確認された総アントシアニンと総プロアントシアニジンの分析法を用いて、国産黒大豆中の機能性成分の実態を把握することを目的として、国内で収穫された黒大豆の測定を行った。その結果、全ての黒大豆中の総アントシアニン量は平均値が 0.90 mg-Cy3GE/g であり、最大値と最小値で 5.6 倍の差異が確認された。一方、総プロアントシアニジン量は平均値が 0.93 mg-CE/g であり、最大値と最小値で 6.6 倍の差異が確認された。

また、収集した全ての黒大豆中の総アントシアニン量の変動係数は 26.3% で総プロアントシアニジン量 (変動係

数: 26.8%) とほぼ同程度であることが示された。5 検体以上が収集できた品種・銘柄での変動は、総アントシアニン量で 9.9~29.2% の範囲であり、品種・銘柄間で 2.9 倍の差があった。総プロアントシアニジン量では 11.3~31.3% の範囲であり、2.7 倍の差があった。また、同一の品種・銘柄における総アントシアニン量と総プロアントシアニジン量の変動係数は、ほぼ同程度であった。これまでに大豆中の微量栄養・機能性成分含量については、西場ら¹⁶⁾ が北海道から九州までの国内各地域の主要品種を含む 31 検体の大豆中のイソフラボン、チアミン、リボフラビン、トコフェロールの定量を行っており、変動係数がそれぞれ 40.7%, 13.0%, 10.3%, 40.5% であることを報告している。このことより、試料が異なるため直接の比較は困難ではあるが、黒大豆中のアントシアニンとプロアントシアニジンの変動はイソフラボンやトコフェロールより小さいと推察された。

本研究で収集した黒大豆の総アントシアニン量と総プロアントシアニジン量には、品種・銘柄間で有意な差 (有意水準 5%) が確認された。これまでに大豆イソフラボンでは品種のみならず産地が含量に影響を与えることが示唆される結果が得られている¹⁶⁾。黒大豆の産地は、表1に示したように品種・銘柄により限定されており、本研究では産地による比較について、十分な解析が行えなかったことから、品種・銘柄による両成分量の差異は品種・銘柄の特性のみに起因するとは断定できなかった。しかしながら、産地による差異について、限定的な結果ではあるが、「丹波黒」を熊本県に位置する九州沖縄農業研究センターで栽培した場合、2011 年度産と 2012 年度産の総アントシアニン量と総プロアントシアニジン量の平均値が、それぞれ 0.99 mg-Cy3GE/g と 0.91 mg-CE/g である一方、その他地域で栽培された同程度の百粒重を示した 5 検体の「丹波黒」(百粒重: $58.0\sim65.1 \text{ g}$) の値が、それぞれ $0.87\pm0.05 \text{ mg-Cy3GE/g}$ (平均値±標準偏差) と $0.88\pm0.16 \text{ mg-CE/g}$ であった。そのため、統計による有意差は検定できなかったが、黒大豆中の総アントシアニン量についてのみ、暖地で栽培すると多くなる可能性が示唆された。

大豆の大きさは、粒径と百粒重が比例関係にあること¹⁷⁾ から、百粒の重さ (百粒重) で比較することが一般的であり、大豆の百粒重と粗蛋白質、粗脂肪ならびにショ糖のような大豆の品質に関わる成分のみならず機能性成分であるイソフラボン量との間の相関関係を調査した結果が既に報告されている¹⁸⁾。そこで本研究では、黒大豆の百粒重と総アントシアニン量もしくは総プロアントシアニジン量との相関関係について検討を行った。その結果、全ての黒大豆の百粒重と総アントシアニン量との関係は図3 (A) に示したように無相関であった ($P=0.18$)。一方、総プロアントシアニジンと百粒重との間には弱い負の相関が認められた ($r_s = -0.332$, 図3 (B))。20 検体以上が収集できた「クロダ

マル」「丹波黒」「光黒」について、それぞれの品種・銘柄での相関を検討した結果、有意水準1%で「丹波黒」の百粒重と総アントシアニン量との間に $r_s = -0.717$ の強い負の相関が、総プロアントシアニン量との間に $r_s = -0.481$ のかなりの負の相関が認められた。一方、「クロダマル」と「光黒」では百粒重と両成分量とは無相関であった、従って、黒大豆では品種・銘柄を限定した場合、百粒重が大きくなると単位重量あたりの両成分量が少なくなることが示唆されたが、多様な黒大豆が混在する新品種開発のための選抜のような場面では、黒大豆の百粒重により両成分量の多少は判断できないと考えられた。

また本研究において、黒大豆中の総アントシアニン量と総プロアントシアニン量との間には強い正の相関 ($r = 0.739$) が認められた。植物体の生合成経路において、アントシアニンとプロアントシアニンの前駆体は共通の化合物(ロイコアントシアニン)であることが知られている¹⁹⁾。本研究の結果では総アントシアニン量が多い黒大豆は総プロアントシアニン量も多い傾向が確認されたため、今回測定した国産黒大豆ではロイコアントシアニンからの生合成経路においてアントシアニンとプロアントシアニンのいずれか一方の成分の生合成に大きく偏った品種・銘柄が存在しないことが示された。

4. 要 約

2010年度から2012年度に国内の各地(北海道、本州、九州)で収穫された116検体の黒大豆中の総アントシアニン量と総プロアントシアニン量を、それぞれpH differential法とDMAC法で定量した。総アントシアニン量はシアニン-3-グルコシド相当で0.25mg/gから1.40mg/gの範囲であり、平均値は0.90mg/gであった。総プロアントシアニン量は(+)-カテキン相当で0.23mg/gから1.52mg/gの範囲であり、平均値は0.93mg/gであった。黒大豆の百粒重は総プロアントシアニン量と弱い負の相関($r_s = -0.332, P < 0.01$)を示したが、総アントシアニン量との間には相関は認められなかった($P = 0.18$)。黒大豆中の総アントシアニン量は総プロアントシアニン量と正の強い相関($r = 0.739, P < 0.01$)を示した。

本研究を行うにあたり、黒大豆試料を提供していただきました九州黒大豆プラットフォーム参画の皆様ならびに九州沖縄農業研究センター・大豆育種研究グループの研究員に深謝いたします。また本研究の実験補助をしていただきました吉永馨子氏に厚くお礼申し上げます。本研究の一部は、農林水産省が実施する新需要創造フロンティア育成事業「高アントシアニン黒大豆のグランドデザインの提案と新需要創造協議会設置支援」(平成24年度)により行われた。

文 献

- 1) 松山善之助, 山下道弘, 矢ヶ崎和弘, 佐藤久泰, 滋味あふれる健康食品—古くから伝わる薬効と機能性, 「黒ダイズ 機能性と品種選びから加工販売まで」, (農山漁村文化協会, 東京), pp. 17-26 (2003).
- 2) Takahata, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Furuta, S., Takahashi, M. and Suda, I., Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5843-5847 (2001).
- 3) Kwon, S.H., Ahn, I.S., Kim, S.O., Kong, C.S., Chung, H.Y., Do, M.S. and Park, K.Y., Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *J. Med. Food*, **10**, 552-556 (2007).
- 4) Kanamoto, Y., Yamashita, Y., Nanba, F., Yoshida, T., Tsuda, T., Fukuda, I., Nakamura-Tsuruta, S. and Ashida, H., A black soybean seed coat extract prevents obesity and glucose intolerance by up-regulating uncoupling proteins and down-regulating inflammatory cytokines in high-fat diet-fed mice. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8985-8993 (2011).
- 5) Choung, M.G., Baek, I.Y., Kang, S.T., Han, W.Y., Shin, D.C., Moon, H.P. and Kang, K.H., Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean *Glycine max* (L.) Merr.). *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5848-5851 (2001).
- 6) Furuta, S., Takahashi, M., Takahata, Y., Nishiba, Y., Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M. and Suda, I., Radical-scavenging activities of soybean cultivars with black seed coats. *Food Sci. Res. Technol.*, **9**, 73-75 (2003).
- 7) Xu, B. and Chang, S.K., Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 7165-7175 (2008).
- 8) ビルベリーエキス定量試験法, 「ビルベリーエキス食品規格基準」(財団法人日本健康・栄養食品協会, 東京), pp. 8-9 (2006).
- 9) 沖 智之, 澤井祐典, 古川(佐藤)麻紀, 須田郁夫, 紫黒米・黒大豆中の総アントシアニンのpH differential法による定量とその試験所間比較による妥当性確認, 分析化学, **60**, 819-824 (2011).
- 10) Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Meth. Enzymol.*, **299**, 152-178 (1999).
- 11) Price, M.L., Scoyoc, S.V. and Butler, L.G., A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 1214-1218 (1978).
- 12) Porter, L.J., Hrstich, L.N. and Chan, B.G., The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry*, **25**, 223-230 (1986).
- 13) Wallace, T.C. and Giusti, M.M., Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins. *J. Food Sci.*, **75**, C619-625 (2010).
- 14) 沖 智之, 菅原晃美, 古川(佐藤)麻紀, 須田郁夫, DMAC法による豆類中の総プロアントシアニジンの定量法, 日本食品科学工学会誌, **60**, 301-309 (2013).
- 15) 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).
- 16) 西場洋一, 須田郁夫, 沖 智之, 菅原晃美, 国内産大豆のイソフラボン, チアミン, リボフラビンおよびトコフェロール含量の変動, 日本食品科学工学会誌, **54**, 295-303 (2007).

-
- 17) 長沢次男, 石川正次, 松本重雄, だいず粒の大きさについて第 1 報 ふるい目の大きさと百粒重との関係, 東北農業研究, **15**, 203-207 (1974).
- 18) 境 哲文, 菊池彰夫, 島田尚典, 高田吉丈, 河野雄飛, 島田信二, ダイズ子実中のイソフラボン含量および組成の品種・系統間差異と子実特性および播種時期との関係, 日作紀, **74**, 156-164 (2005).
- 19) Xie, D.Y. and Dixon, R.A., Proanthocyanidin biosynthesis—still more questions than answers? *Phytochemistry*, **66**, 2127-2144 (2005).
- (平成 25 年 4 月 23 日受付, 平成 25 年 7 月 1 日受理)
-