DMAC 法による豆類中の総プロアントシアニジンの定量法

沖 智之*, 菅原晃美, 古川(佐藤)麻紀, 須田郁夫

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

4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) Method for Determination of
Total Proanthocyanidin Content in Grain Legumes

Tomoyuki Oki*, Terumi Sugawara, Maki Sato-Furukawa and Ikuo Suda

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

A method based on the 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) method was optimized for determination of total proanthocyanidin content in grain legumes using 96-well microplates. The recovery determined for a milled soybean material spiked with black soybean seed coat extract equivalent to 1.0, 2.0 and 4.2 mg/g of proanthocyanidin ranged from 96.1 to 97.9%. Duplicate determinations of total proanthocyanidin content in eight different grain legumes were performed on three different days. Statistical treatment revealed that the relative standard deviation of the repeatability (RSD_r) and the relative standard deviation of the intermediate reproducibility (RSD_{int}) for determination of total proanthocyanidin content was 0.5 to 4.1% and 0.9 to 4.7%, respectively. The HorRat values ($RSD_{int}/\text{predicted } RSD_R$) ranged from 0.17 to 0.87. This demonstrates that the proposed method for determining total proanthocyanidin content in grain legumes had good intralaboratory reproducibility. The contents of proanthocyanidin, ranging from 0.33 to 2.97 mg/g, in 59 samples of black soybean determined by the DMAC method were strongly correlated to those determined by the vanillin-sulfuric acid method ($r=0.980$). However, the contents in black soybeans determined by the vanillin-sulfuric acid method were higher when compared with the DMAC method in almost all samples, when the content obtained by the DMAC method was directly compared to that obtained by the vanillin-sulfuric acid method.

(Received Dec. 17, 2012; Accepted Feb. 12, 2013)

Keywords : black soybean, DMAC method, grain legumes, total proanthocyanidin**キーワード** : 黒大豆, DMAC 法, 豆類, 総プロアントシアニジン

プロアントシアニジンは主にカテキンやエピカテキン(フラバン-3-オール)を基本単位とし, それらが互いに炭素-炭素結合を介して縮合した化学構造で, 2量体からポリマーまで多様な重合度で存在するポリフェノールの一種である。プロアントシアニジンはシダ植物から裸子・被子植物まで広く分布しており, 食用植物では果実類, 種実類, 豆類, 穀類, 香辛料などに存在する¹⁾。米国の一般的な食品の中では, プロアントシアニジン含量が高い作物の多くはベリー類や種実類に属し, 日本でも良く食される豆類にもプロアントシアニジンは多く含まれている²⁾。さらに, 食事に含まれるプロアントシアニジンは, 高い抗酸化能に加えて, 心血管疾患や癌などの疾病の発症リスクを低減する可能性³⁾も有することから注目されている。

豆類の一種である黒大豆 (*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⁴⁾。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, 機能性成分であるプロアントシアニジンが含まれていること⁵⁾, さらに黒大豆種皮抽出物が抗糖尿病作用⁶⁾を示すことなどが明らかになるにつれ, 黒大豆は機能性食品素材として注目を浴びようになってきた。このような背景を受けて, 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」⁷⁾の九州地域での栽培面積は拡大しつつあり, また「クロダマル」を利用した新たな商品の開発も進んでいる。その一方で, 黒大豆中の機能性成分であるアントシアニンやプロアントシアニジンを定量するための標準化された方法は存在しなかった。そこで農業・食品産業技術総合研究機構では, まず黒大豆中のアントシアニンの分析法について標準化に取り組み, 確立した分析法について試験所間比較により妥当性を確認した⁸⁾。しかしながら, 黒大豆におけるもう一つの主要な機能性成分であるプロアントシアニジンについては, 未だ標準

〒861-1192 熊本県合志市須屋 2421

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

化された分析法がない状態にあった。

プロアントシアニジンは多様な化学構造で存在するため、その定量には比色法が用いられ、総量で測定することが一般的である。定量法としては、Folin-Ciocalteu 法⁹⁾やバニリン硫酸法¹⁰⁾、また酸性ブタノールを用いた方法¹¹⁾が広く用いられているが、これらを利用するに当たっては、以下のような問題点があり、注意が必要である。例えば、1) Folin-Ciocalteu 法は特異性が低く、他のポリフェノールも呈色するため、プロアントシアニジン以外のポリフェノールを含む試料で定量値が高く見積もられる⁹⁾。2) バニリン硫酸法は特異性が高いが、酸性条件下で反応させ、500 nm における吸光度を測定するため、黒大豆やベリー類のようにアントシアニンを含む試料では、アントシアニンの吸光度がプロアントシアニジンに由来する呈色化合物の吸光度に加わり、プロアントシアニジン量が多く見積もられる可能性が指摘されている¹⁰⁾。3) 酸性ブタノールを用いた方法は、プロアントシアニジンを加水分解によりアントシアニジンに変換して定量する。そのため、アントシアニンを含む試料ではアントシアニン由来のアントシアニジンも同時に生成されることから、定量値が高く見積もられる¹¹⁾。

これらに対して、4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) 法は、バニリン硫酸法とアルデヒドを用いる点では同じであるが、反応様式が異なること、特異性と検出感度がより高いことが報告されている¹²⁾。さらに、DMAC とプロアントシアニジンの呈色化合物の吸光度を 640 nm で測定するため、共存するアントシアニンの影響を受けないという利点がある。すでに DMAC 法については、(+)-カテキンを用いて反応条件を詳細に検討した報告¹³⁾があり、またクランベリー粉末¹⁴⁾やチョコレート菓子¹⁵⁾を対象として、分析精度を確認した事例もある。

そこで本研究では、すでに報告されている DMAC 法^{13)~15)}をもとに一部改変を加え、豆類の中でも特に黒大豆を測定対象として条件検討を行い最適化するとともに、黒大豆をはじめプロアントシアニジンが含まれている8種の豆類について単一試験室における分析精度を確認した。さらに黒大豆についてはDMAC法とバニリン硫酸法との定量値の比較を行い、分析法の特性を比較した。

実験方法

1. 試料

プロアントシアニジン定量法の条件検討に用いた黒大豆は滋賀県産「丹波黒」と福岡県産「クロダマル」である。単一試験室での分析精度の確認では、黒大豆「丹波黒」、秋田県産茶大豆、北海道産小豆(大納言小豆)、北海道産赤いんげん豆(大正金時豆)、北海道産黒いんげん豆、岡山県産大角豆(備中だるまささげ)、北海道産中長うずら豆、アメリカ産レッドキドニー豆を用いた。いずれも全粒を使用した。

2. 試薬

DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyde) は Sigma-Aldrich 社より購入した。(+)-カテキン水和物 (CAS 登録番号 225937-10-0) は、Sigma-Aldrich 社 (純度 $\geq 98\%$)、Cayman Chemical 社 (純度 $> 98\%$) ならびに Spectrum Laboratory Products 社 (純度約 98%) の3社から購入した。(+)-カテキン (CAS 登録番号 154-23-4) は Extrasynthese 社 (純度 $\geq 99\%$) より入手した。水は日本工業規格 (JIS K0557:1998) で規定されているクラス A3 以上のものを用いた。その他の試薬は市販の特級試薬をそのまま使用した。

3. 試薬溶液の調製

(1) DMAC 溶液

DMAC を溶解する溶液は、塩酸 (3 mL) をアッセイ溶液 A (エタノール:メタノール:2-プロパノール=90:5:5) 27 mL に添加した後、4℃で15分間冷却して調製した。本溶液に DMAC (30 $\pm$ 1 mg) を添加し、攪拌により溶解させて、使用直前まで4℃で保管した。

(2) (+)-カテキン標準溶液

(+)-カテキン水和物 (22.0 $\pm$ 0.5 mg) を精秤し、アッセイ溶液 B (アッセイ溶液 A:水=95:5) に溶解させた後、50 mL 容の全量フラスコに移し、アッセイ溶液 B で定容することで標準原液を調製した。(+)-カテキン標準原液の濃度は、メタノールで10倍希釈した溶液の280 nm における吸光度を測定し、下記の式に従って算出した。

$$C = \frac{A_{\text{std}} \times \text{MW} \times 10^4}{\epsilon \times l}$$

ここで、C: (+)-カテキン標準原液の濃度 (mg/L), A_{std} : 希釈した標準溶液の280 nm における吸光度, MW=290.27: (+)-カテキンの分子量 (g/mol), ϵ =3988: メタノールでのモル吸光係数¹⁶⁾ ($\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), l : 光路長 (cm) である。

(+)-カテキンの検量線溶液は、小分けにした標準原液にアッセイ溶液 B を添加して、20 倍に希釈した後、さらに濃度が3/4, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 になるようにアッセイ溶液 B を用いて希釈することで調製した。なお、(+)-カテキン検量線の濃度は、(+)-カテキン水和物が一水和物として存在すると仮定した場合、名目上1.25~20 mg/L ((+)-カテキンとして) の範囲である。

4. 試料抽出液の調製

試料の粉碎は超遠心粉碎機 (Retsch 社製, ZM-200) にスクリーンメッシュ 0.50 mm を装着し、10000 rpm で行った。粉碎した試料 (約 1 g) を遠心沈殿管 (50 mL 容, スクリューキャップ付硬質ガラス製) に 1 mg 単位で精秤し、AWA 溶液 (アセトン:水:酢酸=70:29.5:0.5) を 9 mL 添加した。キャップを締め、ボルテックスミキサーで30秒間激しく攪拌した後、遠心沈殿管を37℃に加温した水道

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Std A	Std A	Std A	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Blank	
C		Std B	Std B	Std B	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 8	Sample 8	Sample 8	Blank	
D		Std C	Std C	Std C	Sample 3	Sample 3	Sample 3	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Blank	
E		Std D	Std D	Std D	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Sample 10	Sample 10	Sample 10		
F		Std E	Std E	Std E	Sample 5	Sample 5	Sample 5	Sample 11	Sample 11	Sample 11		
G		Std F	Std F	Std F	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 12	Sample 12	Sample 12	Well Blank	
H												

Fig. 1 Layout of the 96-well microplate for the determination of total proanthocyanidin content measured by DMAC method

The nominal concentrations of (+)-catechin were 1.25, 2.5, 5.0, 10, 15 and 20 mg/mL for Std A, Std B, Std C, Std D, Std E and Std F, respectively, calculated by using molecular weight of 308.28 for (+)-catechin monohydrate.

水を満たした超音波洗浄器に入れ、 40 ± 5 kHz の発振周波数で、5 分間超音波処理を行った。超音波処理の間、1 分後と 3 分後に遠心沈殿管を振り、2 回懸濁させた。5 分間の処理後、超音波の発生を停止し、さらに 37°C で 10 分間、静置状態で抽出を行った。なお、超音波停止から 5 分間経過後に、ボルテックスミキサーで 30 秒間、激しく攪拌した。抽出後、遠心分離 ($1870 \times g$, 25°C , 15 分間) を行い、遠心沈殿管の上清を 25 mL 容の全量フラスコに移した。残渣には 8 mL の AWA 溶液を添加し、同様な抽出操作を超音波処理から 2 回繰り返し、合計 3 回の抽出を行った後、AWA 溶液を用いて定容した。

なお、総プロアントシアニジンを測定する場合は、試料溶液中の水分含量を 5% (v/v) になるように調整した。すなわち、試料抽出液をアッセイ溶液 A で必ず 6 倍希釈し、さらなる希釈が必要となる場合は、アッセイ溶液 B で希釈した。

5. DMAC 法による総プロアントシアニジン測定

試料溶液、(+)-カテキンの標準溶液もしくは試薬ブランク (アッセイ溶液 B) を Fig. 1 に示したレイアウトに従って、96 穴プレートのウェルに $40 \mu\text{L}$ ずつ 3 反復で分注した。なお、プレートの外周ウェルには水 ($240 \mu\text{L}$) を満たし、ウェルブランクにはアッセイ溶液 B ($240 \mu\text{L}$) を分注した。次いで、多チャンネルマイクロピペッターを用いてプレートの外周とウェルブランク以外の各ウェルに

DMAC 溶液 ($200 \mu\text{L}$) を分注した。プレートをミキサーで 30 秒間攪拌した後、プレートの上面にプレートシールを貼付し、庫内温度を 30°C に設定したプレートリーダー (BioTek 社製, Synergy HT) で 640 nm における吸光度を 30 秒間隔で 15 分間、測定した。

6. 総プロアントシアニジン量の算出方法

DMAC 法では反応開始から急激に吸光度が上昇して最大となった後、徐々に減少することが知られており、最大吸光度値が総プロアントシアニジン量の算出に用いられる。そのため、本研究においても、総プロアントシアニジン量の算出には、各ウェルの最大吸光度値 (以下、吸光度値と省略する) を用いた。なお、標準溶液では吸光度値を与える反応時間は測定ごとに異なっていたが、反応開始 1.5 分後から 4 分後の間に最大となる時間が存在した (Fig. 2)。また、試料抽出液でも標準溶液と同様な反応時間で吸光度値が得られた (Fig. 2)。総プロアントシアニジン量の算出は、各ウェルの吸光度値から試薬ブランクの吸光度値を差し引いた後、標準溶液の濃度 (mg/L) を X 軸に、標準溶液の吸光度値を Y 軸にプロットして、検量線を作成し、試料中の総プロアントシアニジンは以下の式に従って、(+)-カテキン相当量で算出した。

$$W_T = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{intercept}}) \times V \times d}{S_{\text{std}} \times m}$$

Fig. 2 Typical absorbance changes during DMAC reaction with six different concentrations of (+)-catechin or extract prepared from grain legumes
○, Std A; ●, Std B; △, Std C; ▲, Std D; □, Std E; ■, Std F; ◇, Sample extract.

ここで, W_T : 総プロアントシアニジン量 (mg/g), A_{sample} : 測定試料溶液の吸光度値, $A_{\text{intercept}}$: 検量線 Y 軸切片の吸光度値, S_{std} : 検量線の傾き, m : 試料量 (g), V : 試料抽出液量 (L), d : 測定時の試料希釈倍率である。

7. 添加回収試験

添加回収試験は, プロアントシアニジンを含まない大豆「フクユタカ」を材料に用いて行った。試料はプロアントシアニジンを含む市販の黒大豆種皮抽出物を材料に添加して調製した。上記の方法に従い試料から抽出液を調製して, 試料抽出液中の総プロアントシアニジン量を測定することで添加回収率を求めた。

8. 単一試験室での併行精度および室内再現精度の確認

標準作業手順書を作成し, それに基づき, プロアントシアニジンを含む豆類 8 種を材料に用いて, 3 日間, それぞれの材料の総プロアントシアニジン量を 1 日に 2 反復測定する実験により, 単一試験室での併行精度および室内再現精度を求めた。なお, 測定は Fig. 1 に示した配置に従ったが, 試料溶液の分注位置は, Excel 2007 (Microsoft 社) で発生された乱数によりランダムになるように決定し, 連続した測定間で試料の分注位置が同一にならないように配した。

9. 標準溶液と試料溶液の安定性試験

(+)-カテキン標準溶液と総プロアントシアニジン量が異なる 4 種の試料溶液をポリプロピレン製のチューブに 200 μ L ずつ分注し, -20°C の冷凍庫内で保存した。両溶液を調製した日を 0 日目として, 1, 5, 8, 14, 22, 29, 37, 50, 62 日後に, 小分けにした標準溶液と試料溶液 (各 1 本) を用いて, 総プロアントシアニジン量を測定した。

10. バニリン硫酸法による総プロアントシアニジン含量測定

バニリン硫酸法は Sun らの原法¹⁷⁾ を 96 穴プレートに適

用した方法¹⁸⁾ を用いた。すなわち, 測定試料溶液, (+)-カテキンの検量線溶液もしくは試薬ブランク (メタノール) を 40 μ L ずつ分注した後, メタノールに溶解した 1% (w/v) バニリン溶液 (100 μ L) と酸性メタノール (硫酸: メタノール = 25 : 75, 100 μ L) を順次, 添加した。30 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間の反応後, 500nm における吸光度を測定した。(+)-カテキンで作成した検量線を用いて, 試料中の総プロアントシアニジンを (+)-カテキン相当量で算出した。

11. 統計解析

水分含量が異なる試料溶液で得られた吸光度値の平均値の差の検定は, 一元配置分散分析 (有意水準 5%) で検定した後, 多重比較検定 (Tukey 法) により行った。異なる vendor の (+)-カテキンで作成した検量線の傾きと切片の差は, 一元配置分散分析で検定した。単一試験室での DMAC 法の精度指標は, 一元配置分散分析を用いて算出した。(+)-カテキン標準溶液と試料溶液の安定性は, 線形回帰モデルを適用して解析した。DMAC 法とバニリン硫酸法で得た黒大豆の総プロアントシアニジン量の相関については, それぞれの分析法で得られた測定値の分布が正規分布に従わない (コルモゴロフ・スミルノフ検定, 有意水準 5%) ことから, スピアマン順位相関係数を求めた。なお, 多重比較検定とスピアマン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。

実験結果および考察

1. 測定条件の検討

(1) 測定に用いるウェルの検討

本研究では多検体の総プロアントシアニジンを同時に定

Fig. 3 Bleaching effect of water content in sample solution on DMAC reaction

Each bar represents mean $\pm$ standard deviation from triplicate measurements. Different letters above the bars represent significant difference ($p < 0.05$) according to Tukey's test.

量することを目的として、96穴プレートを用いる方法について最適化を行った。今回の定量法では、プレートリーダーを用いて、一定温度に保たれた庫内で経時的に吸光度の測定を行うが、一般にこのような方法では、プレートのエッジ効果や温度勾配などに起因してウェル間で不均一な測定結果が得られることが知られている。そこで、本測定法においても不均一性の有無について検討するため、同一濃度の試料（(+)-カテキン溶液と黒大豆種皮抽出液）を96穴プレートのすべてのウェルに分注し、吸光度を測定した。

その結果、96穴すべてのウェルの吸光度値を用いて算出した変動係数は、(+)-カテキン溶液と黒大豆種皮抽出液で、それぞれ1.8%と1.4%であったが、プレートの外周ウェルを除いた場合では変動係数は、それぞれ1.1%と0.9%にまで減少した。このことから、測定検体数は少なくなるが、外周ウェルを用いないで測定した方が、分注位置による吸光度の差が小さくなり、分析精度の向上が図れることから、外周ウェルを用いないプレートレイアウト (Fig. 1) を採用することにした。なお、本レイアウトでは、検量線溶液6検体と試料12検体が、3反復で測定可能となった。

(2) 測定試料の水分含量の影響

DMAC法ではアッセイ溶液に水分が含まれると吸光度値が減少することが知られている¹³⁾。今回最適化を行った方法では、水が30%含まれているAWA溶液を用いて抽出液を調製した後、希釈して測定が可能のため、試料溶液中の水分が測定値に及ぼす影響について検討する必要がある。そこでAWA溶液に溶解させた黒大豆抽出物の溶液にAWA溶液とアッセイ溶液Aを各種の割合で添加して、黒大豆抽出物濃度が一定で水分含量が異なる測定試料を調製し、DMAC法で測定を行った。なお、測定試料の水分含量は3.0~9.0%の範囲で検討した。

測定結果はFig. 3に示したように、測定試料の水分含量

Fig. 4 Calibration plot comparison of (+)-catechin from four vendor by DMAC method

(+)-Catechin monohydrate (Cas No. 225937-10-0) was obtained from vendor A, B, or C, and (+)-catechin anhydrous (Cas No. 154-23-4) was obtained vendor D.

が9.0%で最も低い吸光度値が得られたが、測定試料の水分含量が低下するに伴い、吸光度値が増大し、ほぼ一定に到達することが示された。多重比較検定 (Tukey 法) により、水分含量が6.0%以下で吸光度値に有意な差が認められなかったことから、測定試料の水分含量は5.0%に設定した。すなわち、AWA溶液で調製した試料抽出液をアッセイ溶液Aで6倍に希釈し、これ以降の希釈は水を5.0%含むアッセイ溶液Bで行う手順とした。

(3) 製造元の異なる(+)-カテキンでの検量線の比較

プロアントシアニジンは総称であり、構成単位、重合度および結合様式により多様な化学構造で植物体に存在する。そのため、プロアントシアニジンを総量として測定する場合、(+)-カテキンやプロシアニジン2量体の相当量で算出されることが多い。Payneら¹⁵⁾は、複数vendorのプロシアニジン2量体で検量線を検討した場合、同一濃度でも吸光度値が大きく異なることを報告している。このことから、プロシアニジン2量体を標準品とした場合、標準品の入手先により測定結果が異なることが懸念された。一方、(+)-カテキンは高純度のものが市販されているが、高価なため標準溶液の調製において少量を精秤せざるを得ず、分析精度の低下要因になると考えられた。以上のことから、標準溶液の濃度はモル吸光係数を用いて算出することとし、(+)-カテキンに加えて、純度はやや低いが高価な(+)-カテキン水和物を複数vendorから入手し、約1.25~20mg/Lの範囲の6点で各3反復の測定により検量線を作成し、比較を行った。

その結果、得られた検量線は、Fig. 4に示したように、すべての(+)-カテキン標準溶液で相関係数が0.999以上であり、4つの検量線の傾きと切片を一元配置分散分析によ

Table 1 Recovery of proanthocyanidin from soybean spiked with different amounts of black soybean seed coat extract by proposed method

Proanthocyanidin spiked (mg/g)	Total proanthocyanidin content (mg/g)			Recovery ^{a)} (%)
	1	2	3	
4.20	4.01	4.14	4.17	97.9±2.0
2.00	1.98	1.94	1.98	96.1±1.3
1.00	0.94	0.95	0.97	96.4±1.1
0	ND ^{b)}	ND	ND	NA ^{c)}

^{a)} Values are mean±standard deviation from triplicate measurements.

^{b)} ND, not detected.

^{c)} NA, not applicable.

り解析したところ、それぞれのP値（有意確率）は0.284（傾き）と0.272（切片）であった。従って、4つの検量線は信頼水準95%以上で同等であると判断され、モル吸光係数を用いて（+）-カテキン濃度を算出すれば、水和水の有無、製造元や純度にかかわらず、同等な検量線が作成できることが示された。

2. 抽出条件の検討

植物体からのプロアントシアニジンの抽出には、AWA溶液が抽出溶媒として一般的に用いられている。そこで本研究では、既報¹⁹⁾の抽出操作をもとに、抽出回数についてのみ、黒大豆品種「クロダマル」を用いて検討を行った。その結果、データは示さないが、抽出の回数が3回目まではプロアントシアニジンが検出されたが、4回目以降の抽出液に含まれるプロアントシアニジンは検量線の範囲以下であったため、豆類からのAWA溶液によるプロアントシアニジンの抽出は3回に設定した。

次いで、プロアントシアニジンを含まない大豆「フクユタカ」に対して、市販の黒大豆種皮抽出物をプロアントシアニジン当量で1.00~4.20 mg/gの濃度範囲で添加して、回収率の検討を行った。その結果、Table 1に示したように、3回繰り返しの平均回収率は96.1~97.9%の範囲であり、AOACの栄養補助食品および植物の化学分析法に関する単一試験室における妥当性確認のガイドライン¹⁾における許容添加回収率（濃度0.1%（1 mg/g）：90~108%、濃度1%（10 mg/g）：92~105%）の範囲内に収まった。なお、「フクユタカ」から同様な抽出操作で得た試料抽出液では、吸光度値は0.004±0.000（平均値±標準偏差、n=3）であり、検量線下限値未満であったため、プロアントシアニジンは検出されなかった（Table 1）。さらに、「フクユタカ」での吸光度値が試薬ブランクでの値（0.003）とほぼ同程度であったことから、「フクユタカ」からはDMACと反応して呈色する成分は抽出されていないと判断された。

3. 単一試験室での併行精度および室内再現精度の確認

以上の検討から条件を設定して作成した標準作業手順書をもとに、プロアントシアニジンが含まれていることが知られている8種の豆類を材料として、1日2回の測定を3

日間繰り返し行い、併行精度および室内再現精度を求めた。その結果、Table 2に示したように、併行相対標準偏差（RSD_r）は0.5~4.1%の範囲であり、レッドキドニー豆（Red Kidney Bean B）以外の試料ではAOACの栄養補助食品および植物の化学分析法に関する単一試験室における妥当性確認のガイドライン¹⁾における併行精度の目安（濃度0.1%：3%、濃度1%：2%）を十分に満たす結果が得られた。レッドキドニー豆の併行精度が他の試料と比較して低かったが、RSD_rとHorwitz式で予測される室間再現相対標準偏差（PRSD_R）の1/2である併行相対標準偏差（PRSD_r）との比（RSD_r/PRSD_r）は1.5であり、同ガイドラインで許容される範囲内であったことから、実質上問題とはなり得ない併行精度であると判断した（データはTable 2に示していない）。

一方、中間再現性相対標準偏差（PRSD_{int}）は0.9~4.7%の範囲であった。AOACのホームページ上での資料²⁾によると、分析精度の評価指標である、RSD_{int}とこれまで室間共同試験の結果から考案されたHorwitz式によるPRSD_Rとの比であるHorRat（RSD_{int}/PRSD_R）が0.3<HorRat≤1.6であると満足のいく分析精度が得られたと評価される。今回の試験では、HorRatは0.17~0.87の範囲であり、うずら豆を除いた7種の材料については許容範囲内であった。うずら豆のHorRatが0.3より小さかったが、測定試料のプレートへの分注はランダムになるように配置していることから、試験の独立性に問題はないと考えられ、マトリックスに依存した結果であると推察された。

4. 標準溶液と試料溶液の安定性

（+）-カテキン標準溶液と試料溶液中のプロアントシアニジンの安定性について、標準溶液と試料抽出液を-20℃の遮光下で保管し、約2ヶ月の期間で検討を行った。Table 3に示したように、保管期間中における（+）-カテキン標準溶液の検量線の相関係数は0.9989以上であり、また検量線の傾きは、保管期間中に10回作成したが、0.0433±0.0011（平均値±標準偏差）で変動係数が2.6%と高い再現性を示した。また、切片は-0.0062~0.0260の範囲にあり、平均値0.0135であった。切片の経時的な変化について、線形回

Table 2 Single laboratory method precision for determination of total proanthocyanidin contents in various grain legumes

		Total proanthocyanidin content (mg/g)				RSD _r ^{a)} (%)	Intermediate precision RSD (%)	PRSD _R ^{b)} (%)	HorRat ^{c)}
		day 1	day 2	day 3	Mean				
Black soybean	1	1.371	1.274	1.307	1.325	1.1	4.0	5.4	0.74
	2	1.385	1.275	1.341					
Brown soybean	1	0.498	0.507	0.510	0.497	2.8	3.1	6.3	0.50
	2	0.468	0.500	0.497					
Azuki bean	1	2.026	2.068	2.038	2.029	1.8	2.1	5.1	0.40
	2	1.958	2.016	2.068					
Red kidney bean A	1	1.867	1.899	1.951	1.908	2.3	2.6	5.1	0.50
	2	1.958	1.872	1.901					
Black kidney bean	1	2.241	2.188	2.269	2.218	1.3	1.8	5.0	0.36
	2	2.173	2.191	2.245					
Cowpea	1	2.499	2.443	2.522	2.497	1.0	2.0	4.9	0.40
	2	2.560	2.446	2.510					
Pinto bean	1	1.635	1.660	1.676	1.658	0.5	0.9	5.2	0.17
	2	1.655	1.657	1.667					
Red kidney bean B	1	1.325	1.346	1.366	1.319	4.1	4.7	5.4	0.87
	2	1.296	1.342	1.238					

^{a)} Repeatability relative standard deviation ; ^{b)} Predicted reproducibility relative standard deviation ; ^{c)} HorRat = Intermediate precision RSD/Predicted RSD_R.

Table 3 Stabilities of (+)-catechin in assay solution B and proanthocyanidin in extracts prepared from black soybeans during storage over approximately 2 months

Day	Slope	Intercept	<i>r</i>	Bean A	Bean B	Bean C	Bean D
0	0.0440	0.0144	0.9997	3.17	1.73	0.82	1.05
1	0.0440	0.0149	1.0000	3.21	1.61	0.79	1.04
5	0.0442	0.0084	0.9998	3.21	1.71	0.82	1.05
8	0.0423	0.0195	0.9993	3.16	1.52	0.78	1.03
14	0.0432	0.0222	0.9989	2.91	1.64	0.77	1.01
22	0.0435	0.0260	0.9990	3.09	1.62	0.78	1.01
29	0.0449	0.0043	0.9998	3.14	1.70	0.84	1.05
37	0.0410	-0.0062	0.9998	3.02	1.66	0.84	1.07
50	0.0435	0.0104	0.9998	3.09	1.60	0.83	1.05
62	0.0425	0.0214	0.9993	3.20	1.73	0.78	1.05
Mean	0.0433	0.0135	0.9995	3.12	1.65	0.80	1.04
RSD (%)	2.6			3.1	4.1	3.6	1.9
Slope				-0.0006	0.0006	0.0002	0.0003
Lower CI _{95%}				-0.0042	-0.0019	-0.0009	-0.0004
Upper CI _{95%}				0.0031	0.0031	0.0013	0.0010
Standard error of slope				0.0016	0.0011	0.0005	0.0003
P-value				0.732	0.602	0.721	0.398

帰モデルを適用して解析した結果、回帰式の傾きにおける P 値は 0.713 であり、傾きは統計的に 0 と区別ができないため、切片の経時的な増減はないことが示された。以上のことから、(+)-カテキン標準溶液はポリプロピレン製チューブに小分けにし、-20℃の冷凍庫で保管した場合、約 2 ヶ月間は使用可能であることが判明した。なお、今回

作成した検量線における吸光度値の範囲は $0.064 \pm 0.005 \sim 0.936 \pm 0.026$ (平均値 ± 標準偏差) であった。

一方、試料溶液では保管期間中に総プロアントシアニジンが経時的に減少すると想定していたが、Table 3 に示したように、線形回帰モデルを適用して測定値の経時的な変化を解析した結果、4 種の試料すべてにおいて回帰式の傾

きは0と区別できないことが統計的に示された。この結果、豆類から調製した抽出液に含まれるプロアントシアニジンは今回の保管条件（-20℃，遮光）では減少しないことが明らかとなった。

5. バニリン硫酸法との相関

バニリン硫酸法はDMAC法と同じく汎用性の高い総プロアントシアニジン量の分析法である。両分析法はアルデヒドであるバニリンもしくはDMACが、プロアントシアニジンを構成単位とするフラバン-3-オール（A環に位置するメタ配向性の水酸基を有する化学構造）に高い特異性で反応することを利用している点で類似しているが、呈色試薬であるバニリンもしくはDMACが反応する部位は両者で異なることが知られている²⁰⁾。そこで、エピカテキンの他、プロアントシアニジンとして2量体から30量体がA-typeとB-typeで存在していることが報告されている黒大豆⁵⁾を用いてバニリン硫酸法で測定した総プロアントシアニジン量を、DMAC法で測定した値と比較した。

今回測定した黒大豆では、Fig. 5に示したように、バニリン硫酸法で測定した場合、0.32~5.26mg/gの範囲に含まれていたが、DMAC法では0.33~2.97mg/gとなり、範囲が狭くなった。両定量値の相関についてスピアマン順位相関係数を求めたところ、相関係数は0.980と高い正の相関を示した。しかしながら、個別の試料について、バニリン硫酸法による定量値をDMAC法と比較すると、0.98~1.77倍（平均：1.33倍）であり、59検体中57検体において高い値を示したから、黒大豆の総プロアントシアニジン量をバニリン硫酸法で測定した場合、ほぼすべての場合において、DMAC法での定量値より高くなると推察された。

この原因の一つとして、黒大豆の種皮中にアントシアニンが含まれていることが考えられ、バニリン硫酸法で総プロアントシアニジン量が多く見積もられた可能性があった。また、DMACもしくはバニリンにおけるプロアントシアニジンとの反応様式については、DMACは強酸性下でプロアントシアニジンの末端のフラバン-3-オール単位と特異的に反応するとされているのに対し、バニリンではプロアントシアニジンの末端単位以外のフラバン-3-オール単位とも反応すること²¹⁾²²⁾が知られている。さらにDMACとプロアントシアニジンとの反応生成物のモル吸光係数がプロアントシアニジンの重合度が異なっても、ほぼ同程度である²¹⁾のに対し、バニリンの場合は重合度の高いプロアントシアニジンよりカテキンの方が反応生成物の吸光度が低くなる²²⁾という両分析法での差異も知られている。そのため、DMAC法とバニリン硫酸法は、アルデヒドを反応に用いる点では同じであっても、プロアントシアニジンとの反応様式が異なることに起因して、バニリン硫酸法が高い値を示したとも考えられた。以上のことを考慮すると、標準化される黒大豆中の総プロアントシアニジン量の分析法には、DMAC法が好適であると考えられ

Fig. 5 Comparison of total proanthocyanidin content in black soybean measured by DMAC method with those measured by vanillin-sulfuric acid method

Dotted line: $y=x$. The correlation was calculated by using a Spearman's rank correlation coefficient (r_s).

た。なお、黒大豆の総プロアントシアニジン量を比較する場合、DMAC法での定量値とバニリン硫酸法での定量値を直接比較することができない点に留意すべきである。

要 約

豆類中の総プロアントシアニジンを定量するために、DMAC法にもとづく96穴プレートを用いた方法の最適化を行った。本法での添加回収率は、プロアントシアニジン当量で1.0, 2.0, 4.2mg/gの黒大豆種皮抽出物を大豆粉砕試料に添加した場合、96.1~97.9%であった。8種の異なる豆類について、2反復の測定を異なる3日間で行った結果、併行相対標準偏差 (RSD_r) と中間再現性相対標準偏差 (RSD_{int}) が、それぞれ0.5~4.1%, 0.9~4.7%の範囲であり、本研究で提案された分析法は良好な室内再現性を示した。DMAC法で定量した59試料の黒大豆中の総プロアントシアニジン含量は0.33~2.97mg/gの範囲であり、バニリン硫酸法での定量値と高い相関を示した。しかしながら、バニリン硫酸法による定量値は、59試料のほぼすべての試料において、DMAC法での定量値より高く、両分析法による定量値を直接比較する場合には、留意すべきである。

本研究の一部は、農林水産省が実施する委託プロジェクト「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」(平成23~25年度)により行われた。

文 献

- 1) Prior, R.L. and Gu, L., Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, **66**, 2264-2280 (2005).

- 2) Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S. and Prior, R.L., Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.*, **134**, 613-617 (2004).
 - 3) Santos-Buelga, C. and Scalbert, A., Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1094-1117 (2000).
 - 4) 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).
 - 5) 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).
 - 6) 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).
 - 7) 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).
 - 8) 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).
 - 9) 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).
 - 10) 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).
 - 11) 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).
 - 12) Hummer, W. and Schreier, P., Analysis of proanthocyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 1381-1398 (2008).
 - 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) Prior, R.L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M.J. and Reed, J., Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 1473-1478 (2010).
 - 15) Payne, M.J., Hurst, W.J., Stuart, D.A., Ou, B., Fan, E., Ji, H. and Kou, Y., Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC. *J. AOAC Int.*, **93**, 89-96 (2010).
 - 16) Kennedy, J.A. and Jones, G.P., Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1740-1746 (2001).
 - 17) Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. and Spranger, I., Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4267-4274 (1998).
 - 18) Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Suda, I. and Sato, T., Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7524-7529 (2002).
 - 19) Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D. and Prior, R.L., Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7513-7521 (2003).
 - 20) Oszmianski, J. and Bourzeix, M., Comparison of methods for determining the content and polymerization of proanthocyanidins and catechins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **5**, 43-50 (1996).
 - 21) McMurrough, I. and McDowell, J., Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. *Anal. Biochem.*, **91**, 92-100 (1978).
 - 22) Hagerman, A.E. and Butler, L.G., Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. *Meth. Enzymol.*, **234**, 429-437 (1994).
- 引用 URL**
- i) AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf (2012. 10. 15).
 - ii) Definitions and calculations of HorRat values from intra-laboratory data. http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/HORRAT_SLV.pdf (2012. 10. 15).
- (平成 24 年 12 月 17 日受付, 平成 25 年 2 月 12 日受理)