本邦産果実のアントシアニン色素に関する研究

(第1報) 交配紫色ブドウ品種, 巨峯のアントシアニン
色素について

芥 田 三 郎*・松 富 直 利**

Studies on Anthocyanin Pigments in Fruits Harvested in Japan

Part I. On anthocyanin pigments in a purple hybrid
grape variety, Kyohō

SABURO AKUTA* and NAOTOSHI MATSUDOMI**

Anthocyanins isolated from Kyohō grapes (a purple hybrid variety; Ishihara-wase×Centennial) were studied by paper chromatography, hydrolysis, partial hydrolysis, color classification and spectroscopy. The major anthocyanins were identified as malvidin-3,5-diglucoside, malvidin-3-monoglucoside, malvidin-3-(*p*-coumaroyl)-monoglucoside, peonidin-3,5-diglucoside and peonidin-3-monoglucoside. Malvidin-3-monoglucoside was the most abundant pigment (40%) in the grapes. Besides, there were two trace pigments that seemed to belong to petunidin or delphinidin forms.

(Received Feb. 10, 1975)

世界で最も生産の多い果実はブドウである。白色種を除き、ブドウの果色はアントシアニン系色素（以下色素と略）によって左右され、その加工食品の色にも関係が深い。それ故に主産地である欧米では、この色素に関する研究が多いが、本邦での主要栽培品種は含まれていない。

WILLSTÄTTER ら¹⁾が、*Vitis vinifera* の主要色素を oenin と命名して以来、色素について多くの研究がなされ、それらの化学構造が明かになるにつれ、色素の同定は分光学的手法が採用されるに至った。また、*Vitis* の種と色素型との関係の研究も RIBÉREAU-GAYON ら^{2)~5)}によって始められた。

色素の分画には、種々の吸着剤を使用したカラム及び薄層クロマトグラフィ法もあるが、本邦産ブドウの多くは種間雑種であり、その色素の種類は両親の形質を受けて極めて多数なので、上記の方法には難点がある。著者は多数の方法を検討した結果、ペーパークロマトグラフ

ィ法（以下 PPC）が最適と認め、RANKINE ら⁶⁾の方法を改良して分離精製を行った。

そこで本邦産品種を果色により数種に分け、まず紫色型で近來生食用として評判の高い巨峯（石原早生×Centennial）の色素につき、1968 年に行った実験結果を報告する。

実験材料及び方法

1. 乾燥果皮試料の調製

1968 年 8 月、よく着色した山口近郊産の巨峯果実（2 kg）を剥皮後、内面の果肉を純水で洗い、濾紙上で大方の水を除去（生果皮 130 g）、凍結乾燥して乾燥果皮 25 g をえた。

2. PPC に使用した溶媒系と濾紙

実験に用いた溶媒系と用途は Table 1 のとおりで、東洋濾紙の No. 50 を使用し、その大きさは特記しない限りは 40×40 cm であった。

* 九州大学農学部食品分析学研究室（福岡市東区箱崎）
Faculty of Agriculture, Kyushu University. Fukuoka-shi.

** 山口大学農学部食品化学研究室（山口市吉田）
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University. Yamaguchi-shi.

Table 1. Solvent systems used for paper chromatography

Composition (Abbreviation)	Proportion (v/v)	Used phase	Application
Isobutanol-acetic acid-water (iBAW)	8:2:3	Miscible	Anthocyanins
n-Butanol-acetic acid-water (BAW)	4:1:5	Upper	Anthocyanins and aglycones
n-Butanol-2N hydrochloric acid (BH)	1:1	Upper	Anthocyanins and products of partial hydrolysis
Acetic acid-hydrochloric acid- water (AHW)	15:3:82	Miscible	
hydrochloric acid-water (HW)	1:99	Miscible	Anthocyanins
Acetic acid-hydrochloric acid- water (Forestal)	30:3:10	Miscible	Aglycones
Formic acid-hydrochloric acid- water (FHW)	5:2:3	Miscible	
Phenol-water (PW)	4:1	Miscible	Sugars
Isopropanol-28% ammonia water (iPA _m)	7:3	Miscible	Organic acids

3. 色素の抽出

試料 5g に冷 0.1% 塩酸-メタノール液 50ml ずつを加え、色素抽出を数回繰返す。完全抽出後、これを合して炭酸ガスを通じながら 25~30°C で減圧濃縮した。この乾固物にエチルエーテルを加え、溶出する不純物を除き、次に石油エーテル、さらに酢酸エチルで同様の処理をして粗色素をえた。

4. 個別色素の分離と精製

粗色素を 0.1% 塩酸-メタノール液に溶解し、iBAW 溶媒を用い PPC を行い、分離した個別色素(以下 IAcy)の R_f 値を測定、色の標準⁷⁾による H-V-C での表色、蛍光の有無の検討などを行った。

次に、20×20 cm の約 20 枚の濾紙に約 1 cm の幅で粗色素液をバー状に塗り、同上溶媒で 24 hr 展開し、IAcy を充分に分離させてから濾紙を乾燥し、各バンド色素(以下 Bd)に切り分けた。これら細長濾紙を Bd ごとに 5% 酢酸-メタノール液で下降法で集めて減圧濃縮した。乾固した IAcy はエチルエーテルで洗浄後、0.1% 塩酸-メタノール液に溶解し、上記と同じ手順で PPC を行い、混在する色素を切り分け、さらに下降法で溶出する方法を繰返して精製した。この際、iBAW で分離しがたい色素に BH を使用した。かくして純化 IAcy を 5% 酢酸-メタノール液としてえる。

5. IAcy の吸収スペクトル測定

純化した IAcy 液は、炭酸ガスを通じながら減圧濃縮乾固し、0.01% 塩酸-メタノール液に溶解する。これらを厚さ 1 cm のセルに入れ、日立 EPS-3T 型自記分光

光度計で 240~660 nm の吸収スペクトルをえ、それらの特徴から色素を判定した。また、セル中の液に 5% 塩化アルミニウム-エタノール液を滴下後の最大吸光部 (λ_{max}) の移動の有無を測定した。

6. IAcy の R_f 値測定と可視光線及び紫外線における色の分類

PPC における展開距離を約 25 cm とし、BAW と BH, AHW と HW の 4 種の溶媒系での R_f 値を測定して HARBORNE の数値⁸⁾と比較した。次にこれらの色を色の標準⁷⁾により分類色で表わし、さらに紫外線下での色名を記した。

7. IAcy の部分的加水分解

減圧濃縮した IAcy 液を試験管にとり、1N 塩酸を加えて沸騰水中で加水分解を行う。5分おきに 20 分までの分解液につき PPC を行い、原色素及び生成色素の R_f 値測定と蛍光検定を行った。

8. アグリコン及び糖分子の同定

前項の加水分解を 100 分間行い、イソアミルアルコールを加えてアグリコンを転溶し、上層部をとって減圧濃縮した。濃縮液は、BAW, Forestal 及び FHW で PPC を行って、それぞれの R_f 値を求め、可視及び紫外線下での色名を色の標準⁷⁾により分類した。

残りの濃縮液は、20×20 cm の濾紙で 4 項と同じ PPC を FHW で行い、アグリコン部を切り取って 0.01% 塩酸-メタノール液に溶出、その吸収スペクトルから λ_{max} を測定し、塩化アルミニウム液滴下による $\Delta\lambda_{vis-max}$ 判定を行った。

水層部は5%カ性ソーダ液で中和し、減圧濃縮乾固後、ピリジンで糖を抽出、ピリジンを揮発後、少量の水に溶解、PWで標品の糖と co-chromatography を行い、anilin hydrogen phthalate 液を噴霧して発色させ、糖分子の検出を行なった。この際、前項の加水分解でえられた中間生成色素の糖分子検出も行った。

9. アシル化色素の酸分子の同定

近紫外外部吸収スペクトルにピークを有する色素は、その0.01%塩酸-メタノール液を約10 mlに濃縮し、10%カ性ソーダ液でアルカリ性とし、水素ガス気流中に放置する。液がコハク色を呈すると、直ちに3N塩酸液を加えて微酸性とし、エチルエーテルで有機酸を抽出する。この抽出液を *p*-coumaric acid など数種の標品と共に iPAcM で PPC を行い、紫外線下で R_f 値を測定し、

Fig. 1. Paper chromatogram of anthocyanins in Kyohō grapes with solvent iBAW

Fig. 2. Absorption spectra of Kyohō's anthocyanins in methanol containing 0.01% HCl

色名を記録した。また、これら有機酸の水溶液及びメタノール液につき、近紫外部の $\lambda_{u.v.max}$ を測定して同定を行った。

10. 色素の組成と定量法

塩基性酢酸鉛沈澱法で精製した巨峯の混合色素の0.01%塩酸-メタノール液を定量的につくり、その $\lambda_{vis.max}$ で検量曲線をつくる。一方、IAcy の同溶液での $\lambda_{vis.max}$ を測定して、IAcy の混在割合を計算した。

実験結果と考察

1. 色素の PPC による分離と精製

0.1%塩酸-メタノール液に溶解した粗色素を iBAW で展開すると、Fig. 1 のように6コのパンド (Bd) に分れた。これら IAcy を下方から Bd 1~6 色素と呼称する。なお、Bd 2と3の間及び Bd 1の下にもやや青味のある Bd を見出したが、微量で同定するに至らなかった。Fig. 1 には、BCG 液撒布による pH 域、H-V-C による表色、紫外線下における色を記載したが、Bd 5と6の間には淡黄色でフラボノール系と推定される色素がなお存在した。これは分離精製を反覆時、濾紙の最上部まで展開させたり、Bd 5と6とを濃縮乾固後、溶剤で洗浄したりして除去すると、pH 域が消失し、両色素の R_f 値が同一となった。

螢光のない Bd 3と4は、3-glycoside (3G) と予想され、これより R_f 値の低い Bd 1と2とは螢光を認めるので、色相の類似性から Bd 1は3の、Bd 2は4の3,5-diglycoside (3,5DG) と推定された。また、色相の類似性から Bd 1, 3, 5と6は同系統の色素と想定され、Bd 2と4は別の同系統色素と考えられた。

2. IAcy の光学的性質

精製 IAcy の0.01%塩酸-メタノール液の吸収スペクトルを Fig. 2 に、特殊な光学的性質を Table 2 に示す。

すなわち、Bd 1と2の $E_{440}/E_{\lambda_{vis.max}}$ は18%より小さく⁸⁾、螢光が認められたので3,5DGと推定され、Bd 3と4とは440 nmでの吸光度大で、比は20%以上であり、螢光が認められぬので3Gと推定された。Bd 5と6とは異なる色素と考えていたが、精製すると光学的諸性質は全く同じであり、305 nm¹¹⁾ 付近に肩があ

Table 2. Spectrophotometric data of individual anthocyanins

Anthocyanin	$\lambda_{\max}$ (nm) in MeOH-HCl	$E_{440}/E_{\lambda_{\max}}$ (as %)	AlCl ₃ $\lambda_{\max}$ (nm)
Bd 1	278, 534	11	0
Bd 2	278, 522	13	0
Bd 3	231, 535	20	0
Bd 4	282, 523	27	0
Bd 5	280, 305, 538	16	0
Bd 6	280, 305, 538	16	0
Reported ^{a)}			
Mv3, 5DG	533	12	(Malvidin-3,5-diglucoside)
Pn3, 5DG	523	13	(Peonidin-3,5-diglucoside)
Mv3G	535	18	(Malvidin-3-monoglucoside)
Pn3G	523	26	(Peonidin-3-monoglucoside)

a) HARBORNE, J.B.: *Biochem. J.*, 70, 22 (1958).

Table 3. Properties of individual anthocyanins with paper chromatography

Anthocyanin	R_f values ($\times 100$) in				Colors ^{a)} in	
	BAW	BH	AHW	HW	visible light	u.v. light
Bd 1	17	03	42	13	Light red purple	Fluorescent purple
Bd 2	19	09	44	16	Dull red	Fluorescent pink
Bd 3	32	15	29	06	Red purple	Dull purple
Bd 4	36	27	32	09	Light red	Dull purplish red
Bd 5	49	51	18	03	Light red purple	Light purple
Bd 6	49	51	18	03	Light red purple	Light purple
Reported ^{b)}						
Mv3,5DG	31	03	42	13	Purple	Fluorescent cerise
Pn3,5DG	31	10	44	17	Magenta	Fluorescent pink
Mv3G	38	15	29	06	Purple	Dull purple
Pn3G	41	30	33	09	Magenta	Dull magenta

a); These colors were classified with *Guide to Color Standard* (1951).b); HARBORNE, J.B.: *Comparative Biochemistry of the Flavonoides*, 23 (1967).

るので同一アシル化色素と推測した。

最初の PPC で2つに分れたのは、淡黄色素が長く展開した当アシル化色素の中間に割って入ったためと考える。BCG液を撒布すると、ALBACHら¹⁰⁾の説のように pH域が存在(Fig. 1)し、Bd 6の下縁は pH 2から4.6に変化している。従って Bd 5は oxonium saltなので red purpleを呈し、Bd 6は carbinol-base となって pale red purpleと淡色になっている。なお、糖の多い果汁を原料とする場合、鉛塩として一旦色素を沈澱させてから精製するので、有機酸や淡黄色素が除かれ、Bdは一つしか現われなかった。

次に、塩化アルミニウム液を被検色素液に加えても $\lambda_{\max}$ の移動がなかったので、巨峰の主要色素は全て

o-hydroxylation⁹⁾のない色素系と考えられる。 $\lambda_{\max}$ を HARBORNE⁸⁾の数値と比較し、蛍光の有無に上述の考察を加えると、Bd 1~4はそれぞれ、malvidin-3, 5-diglucoside (Mv3, 5DG), peonidin-3, 5-diglucoside (Pn 3, 5DG), malvidin-3-monoglucoside (Mv3G)及び peonidin-3-monoglucoside (Pn3G)と推測された。Bd 5と6とは色及び $\lambda_{\max}$ から Mv系であり、蛍光が±である点から monoglucosideのアシル化色素と推測された。

3. R_f 値と、色及び蛍光の比較

4種の溶媒で PPCを行ったときの R_f 値を HARBORNE⁸⁾の報告と比較し、色の標準⁷⁾により分類した色を記載したのが Table 3である。

すなわち、BAW を除いて Bd 1~4 の R_f 値からの推定は、上述の推論とよく一致している。色名については、HARBORNE⁹⁾ が通称名で表色しているのが比較できないが、色合や蛍光の性質はよく似ている。なおここでも、Bd 1, 3, 5 及び 6 は同系統の分類色に属し、Bd 2 及び 4 に比し紫色が強く、後者は逆に赤みに勝っていて、全て *o*-hydroxylation²⁾ の性質を示さないから前者は Mv 系、後者は Pn 系と推察される。

また、BAW や BH のような有機性溶媒系での R_f 値と、AHW や HW のような水性溶媒での R_f 値とが逆転していることは、Bd 1 と 2 とが水溶性の大きい 3, 5 DG である証明となる。Bd 5 と 6 とは、同一色素であることを示し、水性溶媒系で R_f 値が小さいことは酸性水溶液に難溶で、芳香族の酸がアシレートしていることを物語る。

Fig. 3. Paper chromatograms of partial hydrolysis products of anthocyanins in Kyohō grapes
O; Original pigments, a and a'; Aglycones, 3 and 3'; 3-Glycosides, 5 and 5'; 5-Glycosides.

4. 部分的酸加水分解による生成色素

10分間部分的酸加水分解を行った色素液につき、BH と AHW で PPC を行った結果を Fig. 3 に示す。

すなわち、有機性溶媒 BH の場合、最終生産物の各アグリコンの R_f 値が最大で、Bd 5 と 6 では原色素の上端と一部重なり、1 色素がテーリングしているように見えたが、アグリコンは明かな蛍光を示すので識別できた。これに反し、水性の AHW では最小の R_f となり、アシル化した Bd 5 及び 6 と容易に識別できた。3, 5 DG と目される Bd 1 と 2 とは AHW で最上位を占め、分解時間を長くすると、蛍光のない 3 及び 3' スポット (3G) が拡がり、それらの R_f 値は Bd 3 及び 4 と一致した。これより遅れて蛍光⁹⁾を示す 5 及び 5' スポットが出現するので、これらを 5G と考えた。

Bd 5 及び 6 からは、アグリコンの他に 1 コずつの色素があり、 R_f 値は Bd 3 と一致したので Mv3G と確認された。

5. アグリコンの同定

IACy を完全加水分解してえたアグリコンを 3 種の溶媒で PPC した R_f 値、色名、蛍光色、 $\lambda_{vis.max}$ 及び Al^{3+} 滴下による $\Delta\lambda_{vis.max}$ を集録したのが Table 4 である。

すなわち、 R_f 値と $\lambda_{vis.max}$ は HARBORNE¹¹⁾ の数値とわずかに相違したが、Bd 1, 3, 5 及び 6 のアグリコンは Mv で、Bd 2 と 4 のそれは Pn と確認された。

6. 糖分子の同定

前記の完全加水分解液から抽出した糖を標品と共に PPC を行った結果は Table 5 の通りである。

すなわち、いずれからでもブドウ糖のみしか検出され

Table 4. R_f values, colors and spectrophotometric data of aglycones

Anthocyanidin	R_f values ($\times 100$) in			Colors in		$\lambda_{vis.max}$ in MeOH-HCl (nm)	$AlCl_3$ $\Delta\lambda_{max}$ (nm)
	BAW	Forestral	FHW	visible light	u.v. light		
Bd 1	57	59	29	Red purple	Fluorescent purple	545	0
Bd 2	71	62	34	Pink	Fluorescent pink	532	0
Bd 3	58	58	28	Red purple	Fluorescent purple	544	0
Bd 4	71	61	34	Pink	Fluorescent pink	533	0
Bd 5	57	58	28	Red purple	Fluorescent purple	543	0
Bd 6	57	58	28	Red purple	Fluorescent purple	543	0
Reported ^{a)}							
Malvidin	58	60	27	Purple	Fluorescent purple	542	0
Peonidin	71	63	34	Magenta	Fluorescent pink	532	0

a); HARBORNE, J.B.: *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, 7 (1967).

ず、部分的加水分解液中の中間生成色素からもブドウ糖のみ検出された。

7. 有機酸分子の同定

Bd 5 と 6 からえた有機酸画分を iPAm で PPC してえた *Rf* 値、螢光色及び $\lambda_{u.v. max}$ を標品のそれらと比較した結果を Table 6 に示す。

すなわち、えた有機酸は $\lambda_{u.v. max}$ が標品のそれとやや

Table 5. Detection of sugar moieties in anthocyanins

Anthocyanin	<i>Rf</i> value ($\times 100$) in PW	Color ^{a)}
Bd 1	34	Brown
Bd 2	34	Brown
Bd 3	34	Brown
Bd 4	34	Brown
Bd 5	34	Brown
Bd 6	34	Brown
Standard sugars		
Glucose	34	Brown
Galactose	38	Brown
Arabinose	50	Red
Rhamnose	60	Yellow

a); Developed with PARTRIGE's reagent.

異なるが、他の性質は一致したので *p*-coumaric acid と同定した。なお、中間生成色素が Mv3G であったので、この色素は Mv3G に *p*-coumaric acid がアシレートした色素と同定した。

8. 結論

以上の結果から、巨峰果皮のアントシアニン色素は Table 7 のように同定された。鉛塩からえた精製混合色素の 0.01% 塩酸-メタノール液の $\lambda_{vis. max}$ は 530 nm であったので、定量的に分画した IAcy の同波長における E 値から混在割合を算出した結果も同表に示す。

なお、Fig. 1 で示したようにこれら 5 種の色素以外に、微量で青色を帯びた色素が存在する。これらは、petunidin 系、または delphinidin 系と推測されるが、産地によりやや多量に含まれていることが判明したので、別に報告する。

巨峰は、故大井上康氏によって石原早生 $\times$ Centennial により作出された 4 倍体品種であるから、*V. vinifera* を 3, *V. labrusca* を 1 の割合での形質を示す筈である。この果皮に Mv と Pn の 3,5DG を含有することは、*V. labrusca* の遺伝形質を現わしているものと考ええる。

要 約

紫色系ブドウ巨峰の乾燥果皮からアントシアニン色素

Table 6. Detection of the organic acid in acylated anthocyanins of Kyohō grapes

Organic acid in anthocyanin	<i>Rf</i> value ($\times 100$) in iPAm	Color in <i>u.v.</i> light	$\lambda_{u.v. max}$	
			in water	in methanol
Bd 5	32	Fluorescent blue	305	305
Bd 6	32	Fluorescent blue	305	305
Standard organic acids				
<i>p</i> -Coumaric acid	32	Fluorescent blue	308	310
Caffeic acid	22	Fluorescent blue	326	326
Ferulic acid	26	Fluorescent green	322	322
Chlorogenic acid	15	Fluorescent green	329	330

Table 7. Results of identification and content ratios of the anthocyanins in Kyohō grapes

Pigment No.	Name of anthocyanin	Estimated ratio (%)
Bd 1	Malvidin-3,5-diglucoside	18
Bd 2	Peonidin-3,5-diglucoside	12
Bd 3	Malvidin-3-monoglucoside	40
Bd 4	Peonidin-3-monoglucoside	10
Bd 5 & 6	Malvidin-3-(<i>p</i> -coumaroyl)-monoglucoside	20

を抽出し、PPC 法で分離精製し、5種の色素につき次のように光学的及び化学的性質を検討して同定を行った。

(1) 各分画色素の 0.01% 塩酸-メタノール液をつくり、可視部及び紫外線吸収スペクトルの諸性質、アルミニウムイオン添加による $\lambda_{vis. max}$ の移動の有無。

(2) R_f 値及び濾紙上の色の分類と蛍光。

(3) 部分的及び完全加水分解による中間生成色素及びアグリコンの R_f 値、色の分類と蛍光色、並びに結合した糖分子の同定。

(4) アシル化した有機酸の同定

以上の結果から、最も多量に含まれるのは、malvidin-3-monoglucoside で約 40 を占め、続いて malvidin-3-(*p*-coumaroyl)-monoglucoside (20%)、malvidin-3,5-diglucoside (18%)、peonidin-3,5-diglucoside (12%) 及び peonidin-3-monoglucoside (10%) の順であった。その他に petunidin 系、または delphinidin 系と思われる2種の色素が存在した。

本報告の要旨は昭和44年4月18日日本食品工業学会第16回大会にて発表した。

文 献

- 1) WILLSTÄTTER, R. and ZOLLINGER, E.H.: *Ann.*, **408**, 83 (1915).
- 2) RIBÉREAU-GAYON, P.: *Comt. Rend. Acad. Agr. France*, **39**, 800 (1953).
- 3) RIBÉREAU-GAYON, P., SUDRAUD, P. and DURQUET, P.M.: *Rev. Gén. Botan.*, **62**, 667 (1955).
- 4) RIBÉREAU-GAYON, J. and RIBÉREAU-GAYON, P.: *Am. J. Enol.*, **9**, 1 (1958).
- 5) RIBÉREAU-GAYON, P.: *Les Composés Phenoliques du Raisin et du Vin* (Institut Nationale de la Recherche Agronomique), Paris (1964).
- 6) RANKINE, B.C., KEPNER, R.E. and WEBB, A.D.: *Am. J. Enol.*, **9**, 105 (1958).
- 7) 日本色彩研究所：色の標準(日本色彩社) (1958).
- 8) HARBORNE, J. B.: *Biochem. J.*, **70**, 22 (1958).
- 9) RODNEY, M.S. and LUH, B.S.: *J. Food Sci.*, **30**, 1002 (1965).
- 10) ALBACH, R.F., KEPNER, R.E. and WEBB, A.D.: *J. Food Sci.*, **30**, 69 (1965).
- 11) HARBORNE, J.B.: *Comparative Biochemistry of the Flavonoids* (Acad. Press), London & N.Y. (1967).

(昭和50年2月10日受理)