セルロース薄層クロマトグラフィー—デンストメトリーに よるブドウアントシアニン色素の簡易分析法[†]

太田 英明*・芥田 三郎*・箴 島 豊*

A Simple and Rapid Analytical Method of Grape Anthocyanin Pigments by Cellulose Thin-Layer Chromatography and Densitometry

HIDEAKI OHTA*, SABURO AKUTA* and YUTAKA OSAJIMA*

A simple and rapid analytical method of anthocyanin pigments in grapes and grape products was developed as follows. The pigments prepared by the basic lead acetate method were spotted on the cellulose thin-layers and separated by two dimensional chromatography. The individual pigments were identified by their locations on chromatogram and other qualitative tests, and determined by densitometry at 530 nm. (1) Nineteen of the known anthocyanin pigments were arrayed on the two dimensional thin-layer chromatogram (the first solvent system, isobutanol-acetic acid-water, 8:2:3; the second solvent system, acetic acid-hydrochloric acid-water, 15:3:82), according to the number of sugars, organic acids and substituted groups (hydroxyl and methoxyl) in the B rings. (2) A linear relationship existed between the amounts (0-50 μ g) of pigments (malvidin-3,5-diglucoside and peonidin-3,5-diglucoside) and their densitometric readings, respectively. (3) Twenty anthocyanins from Concord grape juice and six anthocyanins (3-monoglucoside pigments only) from Hiro Hambrug grapes were characterized by this method.

(Received Sept. 22, 1978)

食品の色は品質上極めて重要な地位を占める。アントシアニンは多くの果実食品の赤色～紫色に貢献する水溶性色素であるが、結合糖の数、位置および種類、アシル基の有無によりその種類は多い。したがって果実およびその加工食品中からのアントシアニン色素（以下色素と略す）の分離・精製にはカラムクロマトグラフィーは適さず、主にペーパークロマトグラフィー（PPC）が汎用されてきた。さらに色素の同定にはクロマトグラフ的方法の他に酸加水分解法、アルカリ分解法ならびに分光学的方法等の化学的に煩雑な方法を併用するため多大な労苦と時間を要するのが現状である。このことは現場分析、特に果実食品中の色素分析、果実発育過程における色素の量的・質的变化の分析を始め、広範な品質評価に

際し分析上のネックとなっている。著者らは食品の品質評価等を目的とし、容易に適用し得るブドウアントシアニン色素の簡易分析法の設定を試みた。構成色素の分離には、分離効率、再現性、迅速性などの検討結果に基づき薄層クロマトグラフィー（TLC）を使用した。微結晶セルロースを吸着剤とした2次元 TLC で既知色素のクロマトグラム上の規則性を検討した結果、各色素間に整然とした配列性が存在することを明らかにした。次いで簡単な定性試験法と組み合わせることによってその配列性が色素の同定に使用し得ることを認め、色素分析の簡便法を設定した。本報では、それらの結果をまとめて報告する。

† ブドウ果汁の品質に関する研究（第6報）（前報，食品工誌，26，116（1979））
Studies on Qualities of Grape Juice (Part 6)

* 九州大学農学部食品分析学教室（〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1）
Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka

試薬および装置

1. 試薬

色素標準品: 少量の 0.1% 塩酸-メタノール液に溶解した既知精製色素¹⁾⁻⁹⁾。ただし cyanidin-3,5-diglucoside および *p*-クマル酸のアシル化した cyanidin-3,5-diglucoside はシソニン (フジサワ製薬) から調製した。

モリブデン酸アンモニウム溶液 (モリブデン試薬)¹⁰⁾: モリブデン酸アンモニウム 4 水塩の飽和溶液を 2*N* 塩酸で pH 2.0 に調節し、クロマトグラムに噴霧、B 環の隣接水酸基の検出に使用した。

2*N* 塩酸: クロマトグラムを酸性化するために用いた。

2. 装置

薄層クロマトグラフィー (TLC): Avicel SF セルロースを吸着剤としてガラスプレート (20×20 cm) に厚さ 300 μ の薄層を作成し、風乾後 80°C で 30 分間活性化を行なった。

分光光度計: 吸光度の測定には日立 Perkin-Elmer 139 型分光光度計を使用した。

反射式デンストメーター: 島津 2 波長クロマトスキャナ CS-900 を使用した。測定波長, 530 nm; 対照波長, 750 nm; スリット幅, 0.35×10 mm; 測定感度, 2; 掃引速度, 20 mm/min の条件を用いた。

結果および考察

1. 2 次元 TLC による色素の配列性

色素の標準品を 1 次元方向に溶媒 iBAW (イソブタノール: 酢酸: 水=8:2:3, v/v) で 20 時間, 2 次元方向に溶媒 AHW (酢酸: 塩酸: 水=15:3:82, v/v) で 2 時間展開した TLC の模式図を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 に見られるように, PPC³⁻⁵⁾に比較して TLC 上の各色素のスポットはより鮮明・緊密であった。各色素は 3-monoglucoside (3 MG) 系色素, 3,5-diglucoside (3,5 DG) 系色素, *p*-クマル酸のアシル化 3 MG 色素およびアシル化 3,5 DG 色素というように, 結合糖の数, アシル基の有無によって先ず 4 グループに大別し得た。

次に各グループの個別色素は色素 B 環の置換基数の差異に基づき 2 系統の色素に分類できた。すなわち置換基数 2 個の cyanidin-peonidin 系列と置換基数 3 個の malvidin-petunidin-delphinidin 系列である。さらに各色素系列は B 環の置換基の種類 (水酸基およびメトキシル基) によって整然と配列することが認められた。すなわちクロマトグラム下方から delphinidin-petunidin-malvidin 系ならびに cyanidin-peonidin 系とメトキシ

Fig. 1. Schematic two dimensional thin-layer chromatogram of anthocyanin pigments from grapes

iBAW; isobutanol-acetic acid-water, 8:2:3, v/v. AHW; acetic acid-hydrochloric acid-water, 15:3:82, v/v. Dl, delphinidin; Pt, petunidin; Mv, malvidin; Pn, peonidin; Cy, cyanidin; 3MG, 3-monoglucoside; 3,5 DG, 3,5-diglucoside; Cm, acylated with *p*-coumaric acid.

ル基の多い方が上方に位置し、直線的に配列した。

繰り返し実験の結果, 上述の個別色素の R_f 値 (移動距離) は吸着剤の厚さ, 温度によって変動するけれども, 色素の配列性ならびに各色素グループの相対的な関係位置は一定であることが認められた。

2. 色素の検定法

前項の色素の配列性を合せ, 本分析法に使用し得る同定法を Table 1 に要約した。本表にはクロマトグラム上に 2*N* 塩酸を噴霧し, 風乾後測定した結果を記載した。

Table 1 に見られるように, peonidin, malvidin および cyanidin の 3,5 DG とそのアシル化色素の計 6 種類は紫外線下で明瞭な蛍光を呈す。また delphinidin, petunidin および cyanidin 系色素はモリブデン試薬の散布によってすべて青色に深色化し, その色は delphinidin 系で最も深い。さらに可視光線下でも各色素の色調は構成アグリコンによって明確に相違しており容易に同定し得る。すなわち peonidin 系色素は最も明るい赤色を呈し, delphinidin 系色素は紫～青色を帯びている。

3. 色素の定量法

(1) 全色素含量の測定

色素含量の測定は色素抽出溶液の吸収極大波長 (λ_{max}) の吸光度を主要色素に換算表示する方法を採用した。しかしながら各色素の分子吸光係数の報告値は一致してお

Table 1. Detection Methods of Grape Anthocyanins on Thin-layer Chromatogram (Avicel SF Cellulose)

Anthocyanin		Fluorescence	Molybdate shift	Color on TLC	Hue*
Peonidin	3 MG	—	—	Red	1
	3,5 DG	+	—		
	3 MG-Cm	—	—		
	3,5 DG-Cm	+	—		
Cyanidin	3 MG	—	+	Purplish red	24
	3,5 DG	+	+		
	3 MG-Cm	—	+		
	3,5 DG-Cm	+	+		
Malvidin	3 MG	—	—	Red purple	23
	3,5 DG	+	—		
	3 MG-Cm	—	—		
	3,5 DG-Cm	+	—		
Petunidin	3 MG	—	+	Reddish purple	22-21
	3,5 DG	—	+		
	3,5 DG-Cm	—	+		
Delphinidin	3 MG	—	+	Purple	21-20
	3,5 DG	—	+		
	3 MG-Cm	—	+		
	3,5 DG-Cm	—	+		

* Classified with "Guide to Color standard," (1951)¹¹⁾. For 3 MG, 3,5 DG, 3 MG-Cm and 3,5 DG-Cm see Fig. 1

らず、また希釈溶媒も異なるため一義的に引用できない。そこでブドウ主要色素 malvidin-3 MG ($\lambda_{\max}^{0.1\% \text{HCl-MeOH}}$ 538 nm) および malvidin-3,5 DG ($\lambda_{\max}^{0.1\% \text{HCl-MeOH}}$ 535 nm) の標準色素の検量線を作成し Fig. 2 を得た。また Fig. 2 から $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 値および色素の分子量を1分子の結晶水を含む塩化物として算出した分子吸光係数を求め、その結果を報告値¹²⁾⁻¹⁵⁾と併せて Table 2 に示した。

Table 2 に見られるように、malvidin-3 MG の分子吸光係数は KOEPPEN らの報告値¹³⁾とほぼ一致した。これに対して malvidin-3,5 DG は報告値¹⁶⁾よりも高い分子吸光係数を示したけれども、測定溶媒が相違するため直接には比較できない。

(2) デンシトメトリーによる検量線の作成

TLC 上の色素濃度とデンシトメーターの読みとの相

Fig. 2. Calibration curves of malvidin-3-mono-glucoside at 538 nm (1) and malvidin-3, 5-diglucoside at 535 nm (2) in 0.1% HCl-MeOH

Table 2. Molecular Extinction Coefficients on the Major Anthocyanin Pigments from Grapes

Pigment	Solvent	$\lambda_{\text{vis.max}}$ (nm)	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	ϵ_{max}^* ($\times 10^4$)
Malvidin-3-monoglucoside	0.1% HCl-MeOH	538	522.0	2.85
Malvidin-3,5-diglucoside	0.1% HCl-MeOH	535	333.5	2.37
Reported ¹²⁾				
Malvidin-3-monoglucoside				
(Koeppen <i>et al.</i> , 1966) ¹³⁾	0.1% HCl-MeOH	538	—	2.95
(Somers, 1966) ¹⁴⁾	0.1% HCl-MeOH	546	—	1.39
Malvidin-3, 5-diglucoside				
(Ribéreau-Gayon, 1959) ¹⁵⁾	0.1% HCl-EtOH	545	—	1.03

* The molecular weights were calculated as the chlorides containing one molecular of water.

関関係を明らかにするためにブドウの代表的な2色素について検量線を作成し Fig. 3 を得た。図から明らかなように malvidin-3,5 DG および peonidin-3,5 DG (塩化物) とともに 0~50 μ g の色素濃度で原点を通る良好な直線を与え、ピーク面積 10 cm^2 以下で色素濃度とデンストメーターの読みとの間に直線関係が成立した。

Fig. 3. Densitometric standard curves of malvidin-3,5-diglucoside (A) and peonidin-3,5-diglucoside (B)

(Densicord: sensitivity, 2; λ_S , 530 nm; λ_R , 750 nm; slit, 0.35 $\times$ 10 mm)

4. 分析操作

以上の検討結果から、ブドウ色素の分析方法を次のように設定した。

(1) 全色素含量の分析

ブドウ果汁：試料 1 ml を 0.1%塩酸-メタノール液で 10 倍以上に希釈し、 $E_{685\text{nm}}$ 値を実測、主要色素の検量線 (Fig. 2) との対照値に希釈倍率 $\times$ 100 を乗じて果汁 100 ml 中に存在する色素含量として算出する。

ブドウ果皮：色素を 0.1%塩酸-メタノール液で抽出し、同様な操作によって果皮 1 g あたりの色素含量に換算表示する。

(2) 個別色素の定性・定量分析

ブドウ果汁：試料 5 ml から塩基性酢酸鉛法³⁾によって調製した粗色素を 2 次元 TLC によって分離し、Fig. 1 および Table 1 によって同定する。その後反射式デンストメーター (測定波長, 530 nm) で各スポットを測定し、測定値の合計を 100% として個別色素の濃度比 (%) を算出する。個別色素の含量は全色素含量に個別色素の比率を乗じて求める。

ブドウ果皮：果皮からの個別色素の定性・定量も上記

の方法に準拠する。

5. 分析例

ヒロハンプルグブドウ果皮の凍結乾燥品 (福岡県園芸試験場産) およびコンコードブドウ果汁 (和歌山県経済連海南工場からの寄贈品) 中の色素について前項の手順にしたがい分析した結果を Table 3 に示した。

Table 3. Analytical Results of Anthocyanin Pigments from Hiro Hambrug Peels and Concord Grape Juice

Anthocyanin	Estimated ratio (%)	
	Hiro Hambrug	Concord
Peonidin	3 MG	27
	3,5 DG	5
	3 MG-Cm	3
	3,5 DG-Cm	2
Cyanidin	3 MG	8
	3,5 DG	2
	3 MG-Cm	5
	3,5 DG-Cm	1
Malvidin	3 MG	—
	3,5 DG	—
	3 MG-Cm	trace
	3,5 DG-Cm	trace
Petunidin	3 MG	34
	3,5 DG	14
	3 MG-Cm	11
	3,5 DG-Cm	4
Delphinidin	3 MG	8
	3,5 DG	11
	3 MG-Cm	9
	3,5 DG-Cm	3
Content		16 mg/g dried skins*
		124 mg/100ml juice**

* Calculated as malvidin-3-monoglucoside

** As malvidin-3,5-diglucoside

For 3 MG, 3,5 DG, 3 MG-Cm and 3,5 DG-Cm see Fig. 1

Table 3 から明らかなように、コンコードブドウ果汁からは Fig. 1 に見られた 19 種類の色素の他にアシル化 petunidin-3,5 DG に対応する色素が認められ、計 20 種類の色素が検出された。コンコードブドウは米国種 (*Vitis labrusca*) の代表的品種であり、本結果は近年の HRAZDINA の報告¹⁶⁾と一致した。これに対してヒロハンプルグブドウはマスカット・ハンプルグ $\times$ 甲州三尺の交雑実生から選抜した品種であり、3 MG 色素のみが検出された。このことは本ブドウが 3,5 DG 色素を含有しない欧州種 (*Vitis vinifera*) の形質を持つことを示すものである。

TLC 上の色素の配列性および 2, 3 の定性試験による同定と *in situ* 分析 (デンストメトリー) を併用する本法によれば、短時間のうちに多数の試料を分析することが可能である。本報では繰り返し実験の回数が少なかつ

たために変動係数等の統計処理を行えなかったが、分析精度は従来のクロマトグラムから色素を抽出しその吸光度を測定する方法に比較してかなり向上していると推定される。

またコンコードブドウのように多種類の色素を含有する試料の *in situ* 分析に本法を適用する場合、各色素スポット間の距離は充分に離しておく必要がある。このため多重展開法を併用の方が望ましく特に冬期(低温)では欠かせない。さらに同定に際し、既知色素を多数含有するブドウ品種、コンコードおよびベリー・アリカントAなどの色素の2次元 TLC も同時に行ない対照として用いることはより正確に色素を同定するために適切な方法であろう。

要 約

果実およびその加工製品の品質評価を目的としたブドウアントシアニン色素の簡易迅速な分析法を設定した。

(1) 既知色素の19種類は、溶媒イソブタノール：酢酸：水=8:2:3 (1次元方向) および酢酸：塩酸：水=15:3:82 (2次元方向) を用いた2次元セルロース薄層クロマトグラム上で、結合糖の数、アシル基の有無およびB環の置換基の差異によって整然と配列した。

(2) クロマトグラム上の色素の配列性および簡単な定性試験の併用によって色素は容易に同定できた。

(3) Malvidin-3,5 DG および peonidin-3,5 DG の色素濃度 (0~50 μg) とデンストメーターの読みとの間には良好な直線関係が成立した。

(4) 分析例としてコンコードおよびヒロハンプルグブドウの色素を分析し、コンコードから20種類の色素、ヒロハンプルグから3MG色素のみから成る6種類の色素を分離・同定した。

本研究を行なうに当たり、試料を御提供頂いた福岡県園芸試験場ならびに和歌山県経済連海南工場の方々に深く

感謝します。

本研究の一部は、昭和52年5月10日日本食品工業学会第24回大会において発表した。

文 献

- 1) 芥田三郎・松富直利：食品工誌，**23**，101(1976).
- 2) 芥田三郎・松富直利：食品工誌，**23**，108(1976).
- 3) 太田英明・箴島 豊・沢村正義・中村 浩・芥田三郎：食品工誌，**23**，345 (1976).
- 4) 松富直利・山村益士・小林邦彦・太田英明・芥田三郎：食品工誌，**24**，279 (1977).
- 5) 松富直利・山村益士・太田英明・箴島 豊・芥田三郎：食品工誌，**24**，342 (1977).
- 6) 芥田三郎・太田英明・箴島 豊：食品工誌，**24**，279 (1977).
- 7) 芥田三郎・太田英明・箴島 豊・松富直利・小林邦彦：食品工誌，**24**，521 (1977).
- 8) AKUTA, S., OHTA, H., SAKANE, Y. and OSAJIMA, Y.: *J. Jap. Food Sci. Technol.*, **24**, 631 (1977).
- 9) 太田英明・芥田三郎・白石真一・箴島 豊：食品工誌，**25**，421 (1978).
- 10) BENTLEY, K.W.: "*The Chemistry of Natural Product. Vol. IV The Natural Pigment*," Interscience Publishers, p. 28 (1960).
- 11) 日本色彩研究所編：色の標準，(日本色彩研究社) (1951).
- 12) FULEKI, T. and FRANCIS, F.J.: *J. Food Sci.*, **33**，72 (1968).
- 13) KOEPPEN, B.H. and BASSON, D.S.: *Phytochem.*, **5**，183 (1966).
- 14) SOMERS, T.C.: *J. Sci. Food Agric.*, **17**，215 (1966).
- 15) RIBÉREAU-GAYON, P.: "*Recherches sur les anthocyanes des végétaux, Application au genre Vitis*", (Librairie Générale de l'Enseignement), Paris, p. 118 (1959).
- 16) HRAZDINA, G.: *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **8**，111 (1975).

(昭和53年9月22日受理)