

ブルーベリー (*Vaccinium* spp.) の品種間における アントシアニン組成および抗酸化能の解析

入角順平¹⁾・十合貴之¹⁾・坂尾こず枝¹⁾・山本雅史²⁾・

福留弘康³⁾・川口昭二³⁾・富永茂人²⁾・侯 徳興^{1)†}

(¹⁾食品分子機能学研究室, ²⁾果樹園芸学研究室, ³⁾附属農場唐湊果樹園)

平成25年1月15日 受理

要 約

ブルーベリー (*Vaccinium* spp.) はアントシアニンを多く含み、機能性食品として注目されている。一方、アントシアニンの組成は品種間で異なると報告されている。本研究では機能性食品利用の視点で、鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園で栽培されている12品種のブルーベリーについて、溶媒のアントシアニン抽出効率やポリフェノール含量、アントシアニン組成、抗酸化能 (DPPH法, ORAC法) を検討した。その結果、50%酢酸-50%エタノールは1%塩酸-99%メタノールとほぼ同等の高い効果を示した。品種間の比較では、ポリフェノール含量、アントシアニン含量、抗酸化能などではジョージアジムが低い値となったが、他の品種間に有意な差は見られなかった。また、ポリフェノール含量と抗酸化能の間には中位・高位の正の相関が認められた。

キーワード：ブルーベリー、アントシアニン、HPLC, DPPH, ORAC

諸 言

ブルーベリー (*Vaccinium* spp.) はアントシアニンを多く含み、機能性素材として注目されている。これまでブルーベリーには、視力改善機能[2, 20], 抗酸化能[1, 8, 14], 抗炎症能[3], がん予防効果[4, 5, 20], 神経保護機能[6, 19, 22], 骨粗鬆症の予防効果[23]やメタボリックシンドロームの予防効果[18, 20, 21]などの機能が報告されている。ブルーベリーは、アメリカ合衆国の北東部から南東部を原産とするツツジ科の低木であり、ミシガン州など比較的寒冷な地域ではハイブッシュブルーベリーが、ジョージア州など温暖な地域ではラビットアイブルーベリーが栽培されてきた。近年では、品種改良の進展によって温暖な気候でも栽培可能な品種であるハイブッシュブルーベリー、すなわち南部ハイブッシュブルーベリーも育成されている。鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園は、長期間にわたってアメリカ

から多くのブルーベリー品種を導入し、栽培している。本研究では唐湊果樹園で栽培されている南部ハイブッシュブルーベリーおよびラビットアイブルーベリー12品種におけるアントシアニン組成および抗酸化能の解析を行った。

アントシアニンは、シダ植物以上の高等植物に広く分布している水溶性ポリフェノールの一種で、アントシアニジンをアグリコンとする配糖体である。アントシアニジンはジフェニルプロパノイド骨格を有するフラボノイドである。B環上の置換基 (水酸基, メトキシ基) の位置や数によって分類され、食材中に存在するアントシアニジンは主にペラルゴニン, シアニジン, デルフィニジン, ペオニン, ペチュニジン, マルビジンの6種である。この中で、デルフィニジンとシアニジンは、他のアントシアニンより抗酸化能[7]や細胞形質転換抑制能[10], 抗炎症能[12], アポトーシス誘導能[11]が高いことが報告されている。これは、B環上の水酸基の数が

† : 連絡責任者: 侯 徳興 (生物資源化学科食品分子機能学研究室)

Tel/Fax: 099-285-8649, E-mail: hou@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

多いことに由来していると考えられている[20]。また、アントシアニンには酸性条件下で安定化する性質があり、これはpHの変化に伴ってフラビリウムイオンを経由した構造変化を起こすため、構造変化によって色調も変化する[20]。アントシアニンは胃腸内において配糖体のままで体内へ吸収され、血液、肝臓、腎臓及び脳等の臓器に検出されており、2～8時間内にメチル化やグルクロン酸抱合を受けて体内から排泄される[13, 15, 16, 20]。

食材のアントシアニンの抽出溶媒では、これまでメタノール-塩酸系のものが主に使われている。これらの有機溶媒は抽出効率がよくアントシアニン分析用として良いが、人体に有害で、食品用溶媒として向かない。また、塩酸などの強酸は、アントシアニンの構造を破壊してしまうので、抽出溶媒としては好ましくない。そこで本研究では、機能性食品成分としてのアントシアニンの利用を目的とするため、食品加工に使用可能な溶媒について検討を行った。1%塩酸-99%メタノール溶媒は、抽出効率がよくアントシアニンの一般的な抽出溶媒であることを考慮し、コントロールとして用いた。また、抽出溶媒の検討には最も果実の採取量の多かったクライマックスを用いた。

材料および方法

1. 実験試料

本試験に用いたブルーベリー12品種（南部ハイブッシュブルーベリー6品種：オニール、ジョージアジム、ブラッデン、パールリバー、マグノリア、シャープブルーおよび、ラビットアイブルーベリー6品種：ノビリス、ウッダード、オースチン、クライマックス、ティフブルー、ブライトウェル）は鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園で栽培されているものを、2011年7月1日から7月29日までの期間で完熟したものだけを選択的に採取した。採取したブルーベリーは軽く水洗後に水分を拭き取り、-20℃で保存した。コントロールとして用いるイタリア産ビルベリーは果実が入手できなかったため、イタリアの企業から購入したビルベリー粉末を使用した。

2. 試薬

抽出用エタノールは日本アルコール製を、Folin-Ciocalteu試薬と6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) はSigma-Aldrich社製を、

Cyanidin-3-glucoside (C3G) は常盤植物化学製を、フルオレセインナトリウムと2,2'-アゾビス(2-アジミノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) は和光純薬工業製を使用した。その他の試薬はすべてナカライテスクから購入したものを使用した。

3. アントシアニンの抽出・精製

凍ったままのブルーベリーを市販のフードミキサーで破碎後、それぞれの溶媒(表1①, ④)をブルーベリーの10倍量加え、振とう培養機(BR-40LF TAITEC)を用いて12時間抽出した。(100rpm, 25℃, 遮光)抽出液をろ過(ADVANTEC No.6)後、エバポレーター(V703アドバンテックフルセットBVCHI)を用いて減圧濃縮し抽出溶媒を飛ばした。濃縮液をHP-20(ダイヤイオン)に付し、蒸留水で洗浄後、50%エタノールで溶出した。回収した溶出液は再びエバポレーターで濃縮し、その濃縮液を凍結乾燥(DRC-1N EYELA)して得られた粉末を試料として用いた。

表1. 抽出溶媒の組成およびpH

| 抽出溶媒 | pH |
|----------------------|------|
| ① 50% 酢酸 - 50% エタノール | 1.30 |
| ② 25% 酢酸 - 75% エタノール | 2.02 |
| ③ 5% 酢酸 - 95% エタノール | 2.68 |
| ④ 1% 塩酸 - 99% メタノール | 0.02 |
| ⑤ 90% エタノール - 10% 水 | 4.30 |
| ⑥ 70% エタノール - 30% 水 | 5.02 |
| ⑦ 100% 水 | — |
| ⑧ 25% 酢酸 - 75% 水 | 2.00 |
| ⑨ 50% 酢酸 - 50% 水 | 1.68 |

抽出溶媒の検討では、破碎したクライマックスの果実にそれぞれの抽出溶媒(表1①~⑨)を10倍量加え、12時間抽出(100rpm, 25℃, 遮光)し、抽出液をろ過したものを試料として用いた。

イタリア産ビルベリーは粉末の状態(アントシアニン含量約40%)から同様の方法で精製したものを使用した。

4. 抽出溶媒の検討

試料を50倍に希釈後、分光光度計(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech)を用いて吸光度を測定し、525nmの吸光度から試料1gあたりのC3G相当量(mg C3G Equivalent/g sample: mg C3GE/g sample)としてアントシアニン含量を算出し、抽出効

率の検討を行った。

5. ポリフェノール定量

試料を0.8mg/mlとなるように50%ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。96穴プレートに試料溶液を10 μ l, 2%Na₂CO₃を200 μ l添加し, 正確に3分後Folin-Ciocalteu試薬を10 μ l添加した。攪拌しながら30分間反応させ, 分光光度計(MULTISKAN FC, Thermo)を用いて595nmの吸光度を測定した。吸光度から試料1gあたりのGallic acid相当量(mg GAE/g sample)としてポリフェノール含量を算出した。

6. アントシアニン含量

各試料を10mg/mlとなるように50%DMSOに溶解し, 分光光度計(NanoDrop 2000/2000c, Thermo)を用いて525nmの吸光度を測定した。吸光度から試料1gあたりのC3G相当量(mg C3GE/g sample)としてアントシアニン含量を算出した。

7. アントシアニン組成の決定

アントシアニン組成の決定は, 高速液体クロマトグラフィーシステム(HPLC: 日本分光製)を用いて行った。分析用カラムはCrestPak C18 T-5 (4.6mm i.d.×250 mm)を使用し, 移動相はバッファーAに1.5%リン酸, バッファーBに1.5%リン酸-20%

酢酸-25%アセトニトリルを使用した。グラジェントの設定はINITIAL-A:B=85:15, 80min-A:B=45:55とし, 流速は0.75ml/min, 検出波長は520nmで分析を行った。検出されたピークは, 既にアントシアニン組成が明らかになっているビルベリー[3]のクロマトグラム(図1)と比較することで同定した。アントシアニン組成はピークの面積%として計算した。

8. ラジカル消去能測定(DPPH法)

試料を0.4, 0.2, 0.1, 0.05mg/mlとなるように50%DMSOに溶解した。96穴プレートに0.1M酢酸バッファー(pH5.5)190 μ lと試料溶液10 μ lを添加し, 0.5 μ M 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラシル(DPPH)を50 μ l加えて30分後に分光光度計(MULTISKAN FC, Thermo)を用いて492nmの吸光度を測定した。Troloxを0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05mg/mlとなるように調整し, 同様の測定を行って以下の計算式によりラジカル消去率(%)を算出した。

$$\text{ラジカル消去率}(\%) = (1 - B/A) \times 100$$

※A=試料を加えていないDPPHと溶媒のみの吸光度

※B=試料を添加した反応液の吸光度

最後に試料の吸光度からTrolox換算濃度(mg TE/mg sample)を求め, IC₅₀(μ g/ml)としてラジカル消去能を算出した。

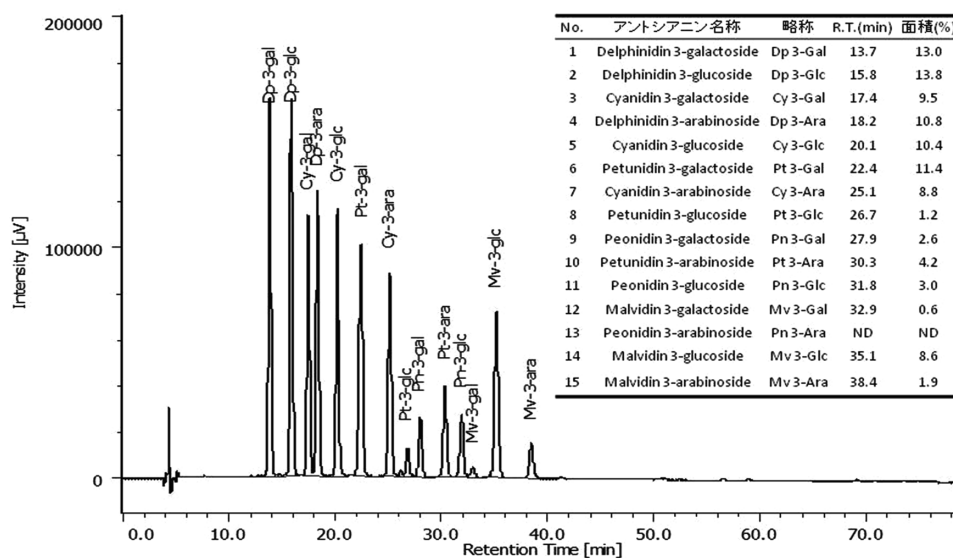


図1. ビルベリーにおけるアントシアニンのクロマトグラム

9. ラジカル吸収能の測定 (ORAC法)

ORAC法による測定はPriorら[17]の方法に一部改変を加えて測定した。試料を0.1mg/mlとなるように50% DMSOに溶解した。蛍光測定用96穴プレートに試料溶液10 μ l添加後、37℃に設定した蛍光測定器 (1420 ARVOsx Ver2.0, Wallac) 内で5分間インキュベートした。蛍光測定器内蔵のインジェクターを用いて7.5nMフルオレセイン溶液100 μ lと63.4mM AAPH溶液40 μ lを添加し、37℃を保ったまま蛍光強度 (Ex 485nm/Em 535nm) を2分おきに2時間測定した。試料を加えた反応液の蛍光経時変化をプロットしたグラフの曲線下面積 (AUC) からブランクのAUCを引いてnet AUCとした。Troloxを400, 300, 200, 100 μ M (0.1, 0.075, 0.05, 0.025mg/ml) に調整して同様に測定し、標準曲線を作成した。ORAC値は試料1gあたりのTrolox相当量 (μ mol TE/g sample) として表した。AUCおよびORAC値の計算式は以下に示す。

$$AUC = (0.5 + f_2/f_0 + f_4/f_0 + f_6/f_0 + \dots + f_i/f_0) \times CT$$

※ 0.5 = 積分定数

※ $f_0 = 0$ minの時の蛍光測定値

※ $f_i = i$ minの時の蛍光測定値

※ CT = サイクルタイム (2分ごとに測定しているので2となる)

$$ORAC = \text{net AUC}_{\text{Sample}} / \text{net AUC}_{\text{Trolox}} \times [\text{Trolox}] / [\text{Sample}]$$

※ $\text{net AUC}_{\text{Sample}} = AUC_{\text{Sample}} - AUC_{\text{Sample Blank}}$

※ $\text{net AUC}_{\text{Trolox}}$ = Sample濃度を標準曲線の式に代入して算出したnet AUC

※ [Trolox] = $\text{net AUC}_{\text{Sample}}$ を標準曲線に代入して

算出したTrolox濃度 (μ mol/L)

※ [Sample] = Sample濃度 (mg/mL)

結 果

1. 抽出溶媒の検討

図2で示しているようにアントシアニンの抽出効率は、一般的な抽出溶媒である1%塩酸-99%メタノール(④)が662mg C3GE/g sampleと最も高く、その次に高いのは50%酢酸-50%エタノール(①)の605mg C3GE/g sampleだった。食品用抽出溶媒の観点から考えると①が最も適している。また、抽出効率を比較するため最も抽出効率の良い④をコントロールとして用いた。よって、以後の実験では①と④の二つを抽出溶媒としてアントシアニンを抽出・精製し、実験に使用した。

2. ポリフェノール含量

図3で示しているように、野生種(ビルベリー)と栽培品種(ブルーベリー)のポリフェノール含量の間に有意差は見られなかった。栽培品種の中ではジョージアジムの50%酢酸-50%エタノール抽出が208mg GAE / g sample、1%塩酸-99%メタノール抽出が260mg GAE / g sampleと低い値を示し、最も高いのはノビリス1%塩酸-99%メタノール抽出の652mg GAE / g sampleだったが、抽出溶媒間に有意差は見られなかった。

3. アントシアニン含量

図4で示しているように、野生種のアントシアニ

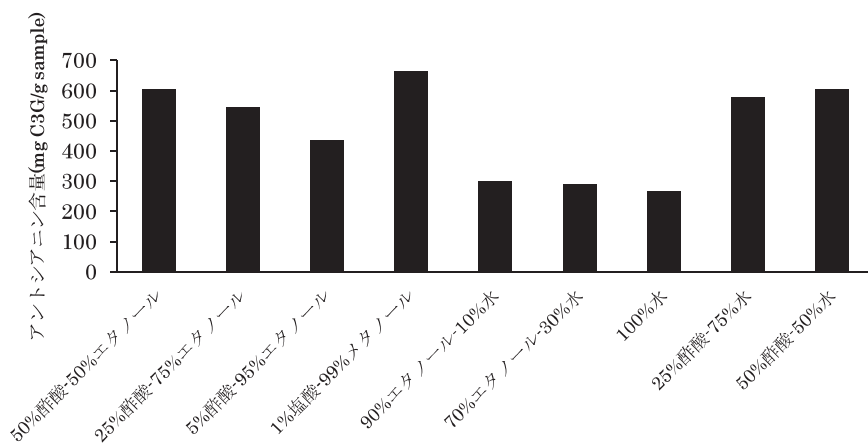


図2. 異なる溶媒によるクライマックス果実抽出液のアントシアニン含量

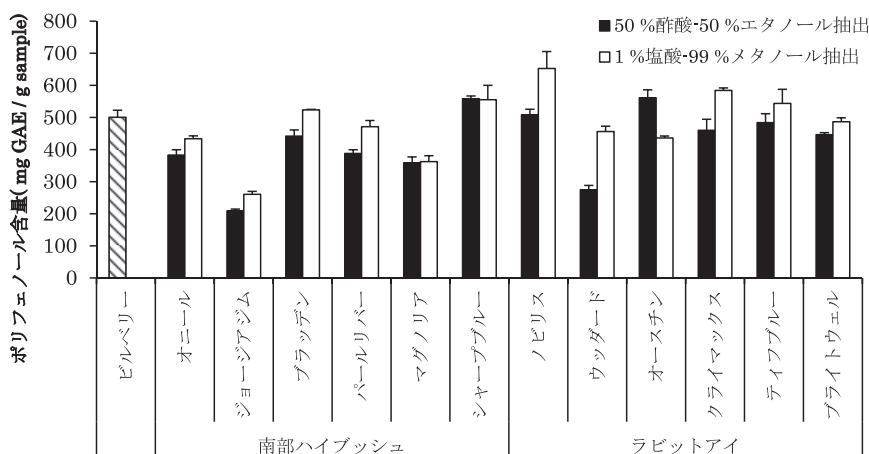


図3. ブルーベリー12品種における果実中のポリフェノール含量

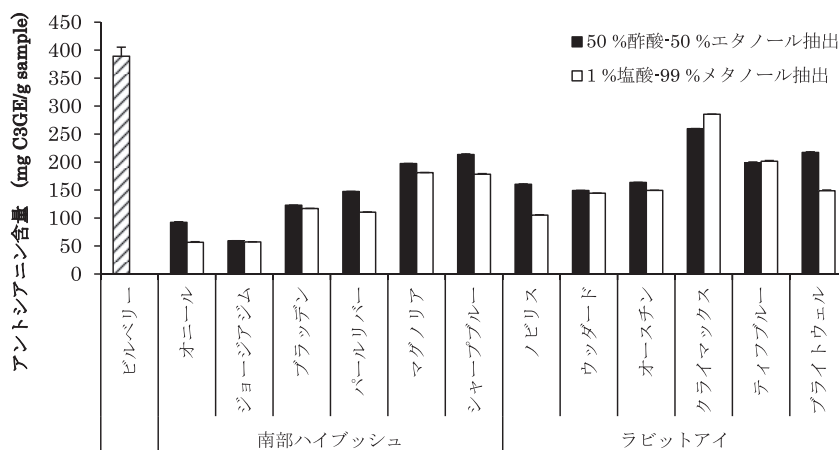


図4. ブルーベリー12品種における果実中のアントシアニン含量

ン含量は389mg C3GE/g sampleで、栽培品種に比べて高い値を示した。栽培品種の中では、オニールの50%酢酸-50%エタノール抽出が92mg C3GE/g sample, 1%塩酸-99%メタノール抽出が57mg C3GE/g sampleで、ジョージアジムの50%酢酸-50%エタノール抽出が59mg C3GE/g sample, 1%塩酸-99%メタノール抽出が57mg C3GE/g sampleであり、他の品種よりも低い値を示し、クライマックスの1%塩酸-99%メタノール抽出が285mg C3GE/g sampleで最も高い値を示した。抽出溶媒間に有意差は見られなかった。

4. アントシアニン組成

表2, 3には品種ごとのアントシアニン組成を南

部ハイブッシュブルーベリーとラビットアイブルーベリーに分けて示した。アグリコン構成と糖鎖構成ごとにまとめたものは表4と表5に示した。アグリコンごとの比較では、デルフィニジン系のアントシアニンが23~42%で、どの品種も含有率が高い傾向が認められた。ウッダードだけはペオニジン系の50%酢酸-50%エタノール抽出が35%, 1%塩酸-99%メタノール抽出が33%で最も高いが、デルフィニジン系も50%酢酸-50%エタノール抽出が23%, 1%塩酸-99%メタノール抽出が27%で他の品種と同程度の含有率を示した。糖鎖ごとの比較では、ガラクトース系のアントシアニンが36~58%でどの品種も多い傾向が認められた。また、アグリコンと糖鎖がどちらにおいても、抽出溶媒の間には有意差は見ら

表2. 南部ハイブッシュブルーベリー果実のアントシアニン組成

| No. | アントシアニン* | 抽出溶媒** | 品 種 名 | | | | | | |
|-----|----------|--------|-------|------|---------|-------|-------|-------|---------|
| | | | ビルベリー | オニール | ジョージアジム | ブラッデン | パルリパー | マグノリア | シャープブルー |
| 1 | Dp-3-gal | 溶媒① | 13.0 | 19.7 | 19.0 | 20.3 | 17.1 | 19.2 | 16.3 |
| | | 溶媒④ | | 21.8 | 18.9 | 24.8 | 19.1 | 20.8 | 15.6 |
| 2 | Dp-3-glc | 溶媒① | 13.8 | 0.5 | 6.9 | 0.5 | 0.6 | 9.2 | 7.7 |
| | | 溶媒④ | | 0.6 | 7.9 | 0.7 | 0.6 | 10.1 | 7.4 |
| 3 | Cy-3-gal | 溶媒① | 9.5 | 4.6 | 7.1 | 8.3 | 15.8 | 2.7 | 3.9 |
| | | 溶媒④ | | 4.7 | 6.7 | 8.5 | 15.5 | 2.6 | 3.4 |
| 4 | Dp-3-ara | 溶媒① | 10.8 | 11.9 | 9.8 | 10.0 | 6.8 | 12.0 | 11.9 |
| | | 溶媒④ | | 11.9 | 9.0 | 9.0 | 7.5 | 11.7 | 10.9 |
| 5 | Cy-3-glc | 溶媒① | 10.4 | 0.3 | 3.3 | 0.3 | 1.3 | 1.1 | 2.0 |
| | | 溶媒④ | | 0.4 | 3.6 | 0.5 | 1.1 | 1.1 | 1.7 |
| 6 | Pt-3-gal | 溶媒① | 11.4 | 14.9 | 9.3 | 14.5 | 18.9 | 12.1 | 11.5 |
| | | 溶媒④ | | 15.2 | 9.8 | 15.7 | 18.8 | 11.7 | 11.0 |
| 7 | Cy-3-ara | 溶媒① | 8.8 | 1.4 | 5.2 | 0.4 | 0.8 | 8.0 | 6.4 |
| | | 溶媒④ | | 1.3 | 6.1 | 0.6 | 0.7 | 7.9 | 6.3 |
| 8 | Pt-3-glc | 溶媒① | 1.2 | 6.5 | 1.8 | 2.2 | 3.5 | 1.4 | 1.2 |
| | | 溶媒④ | | 6.2 | 1.8 | 2.4 | 3.3 | 1.3 | 1.2 |
| 9 | Pn-3-gal | 溶媒① | 2.6 | 0.3 | 4.5 | 4.9 | 4.6 | 5.2 | 5.6 |
| | | 溶媒④ | | 0.0 | 4.0 | 4.2 | 4.6 | 4.9 | 5.7 |
| 10 | Pt-3-ara | 溶媒① | 4.2 | 1.1 | 1.7 | 4.8 | 0.7 | 0.6 | 1.4 |
| | | 溶媒④ | | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 0.6 | 0.5 | 1.5 |
| 11 | Pn-3-glc | 溶媒① | 3.0 | 23.1 | 14.1 | 17.9 | 19.8 | 13.1 | 13.4 |
| | | 溶媒④ | | 23.2 | 13.1 | 22.8 | 18.8 | 11.6 | 14.4 |
| 12 | Mv-3-gal | 溶媒① | 0.6 | 0.4 | 6.5 | 0.7 | 1.0 | 0.0 | 0.6 |
| | | 溶媒④ | | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.9 | 0.0 | 0.6 |
| 13 | Pn-3-ara | 溶媒① | ND | ND | ND | 0.5 | ND | ND | ND |
| | | 溶媒④ | | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 14 | Mv-3-glc | 溶媒① | 8.6 | 0.9 | 0.2 | 0.9 | 1.2 | 9.2 | 9.2 |
| | | 溶媒④ | | 1.0 | 8.0 | 1.0 | 1.1 | 9.1 | 10.3 |
| 15 | Mv-3-ara | 溶媒① | 1.9 | 13.8 | 7.3 | 10.1 | 7.5 | 6.1 | 8.5 |
| | | 溶媒④ | | 12.7 | 5.9 | 8.6 | 7.2 | 6.2 | 9.8 |

*略号は図1を参照

**溶媒①：50%酢酸-50%エタノール 溶媒④：1%塩酸-99%メタノール

れなかった。

5. ラジカル消去能 (DPPH法)

ビルベリーとブルーベリーの間に有意差は見られなかった。ラジカル消去能のIC₅₀値は、ジョージアジムの50%酢酸-50%エタノール抽出が^a29μg/ml, 1%塩酸-99%メタノール抽出が^a19μg/mlでウッダードの50%酢酸-50%エタノール抽出が^a20μg/mlと、他のブルーベリー品種より低い抗酸化能を示した。抽出溶媒間には有意差は見られなかった。

6. ラジカル吸収能 (ORAC法)

ビルベリーとブルーベリーの間に有意差は見られなかった。ORAC値は、ジョージアジムの50%酢酸-50%エタノール抽出が770μmol TE/g sample, 1%塩酸-99%メタノール抽出が1106μmol TE/g sampleでウッダードの50%酢酸-50%エタノール抽出が959μmol TE/g sampleであり、他のブルーベリー品種より低い抗酸化能を示した。抽出溶媒間に有意差は見られなかった。

7. ポリフェノール含量と抗酸化能の相関

ポリフェノール含量とラジカル消去能 (DPPH法)

表3. ラビットアイブルーベリー果実のアントシアニン組成

| No. | アントシアニン* | 抽出溶媒** | 品 種 名 | | | | | | |
|-----|----------|--------|-------|------|-------|-------|---------|--------|---------|
| | | | ビルベリー | ノビリス | ウッダード | オースチン | クライマックス | ティフブルー | ブライトウェル |
| 1 | Dp-3-gal | 溶媒① | 13.0 | 12.7 | 15.8 | 18.8 | 13.3 | 15.7 | 18.2 |
| | | 溶媒④ | | 13.2 | 19.0 | 21.1 | 13.9 | 16.0 | 22.2 |
| 2 | Dp-3-glc | 溶媒① | 13.8 | 4.3 | 0.9 | 6.5 | 5.7 | 4.2 | 0.5 |
| | | 溶媒④ | | 4.5 | 1.0 | 9.7 | 6.1 | 4.5 | 0.7 |
| 3 | Cy-3-gal | 溶媒① | 9.5 | 15.9 | 6.5 | 7.9 | 10.3 | 13.3 | 13.9 |
| | | 溶媒④ | | 15.6 | 6.4 | 9.0 | 10.3 | 13.1 | 14.1 |
| 4 | Dp-3-ara | 溶媒① | 10.8 | 6.2 | 7.1 | 9.8 | 6.2 | 7.1 | 7.6 |
| | | 溶媒④ | | 6.3 | 7.4 | 10.7 | 5.9 | 6.4 | 5.0 |
| 5 | Cy-3-glc | 溶媒① | 10.4 | 5.4 | 0.7 | 2.7 | 4.9 | 4.2 | 1.4 |
| | | 溶媒④ | | 5.4 | 0.7 | 2.5 | 5.0 | 4.9 | 1.6 |
| 6 | Pt-3-gal | 溶媒① | 11.4 | 13.6 | 15.5 | 15.2 | 11.7 | 13.4 | 17.0 |
| | | 溶媒④ | | 13.5 | 15.3 | 13.9 | 11.4 | 12.9 | 16.6 |
| 7 | Cy-3-ara | 溶媒① | 8.8 | 4.5 | 1.0 | 6.3 | 5.9 | 3.9 | 0.5 |
| | | 溶媒④ | | 4.7 | 1.2 | 5.7 | 6.1 | 4.2 | 0.7 |
| 8 | Pt-3-glc | 溶媒① | 1.2 | 4.1 | 2.6 | 1.7 | 2.7 | 3.5 | 3.8 |
| | | 溶媒④ | | 4.0 | 2.4 | 1.3 | 2.6 | 3.5 | 3.9 |
| 9 | Pn-3-gal | 溶媒① | 2.6 | 3.0 | 4.5 | 4.4 | 3.1 | 3.2 | 4.2 |
| | | 溶媒④ | | 3.0 | 4.2 | 3.6 | 2.8 | 3.0 | 2.9 |
| 10 | Pt-3-ara | 溶媒① | 4.2 | 4.6 | 0.8 | 1.6 | 3.9 | 3.5 | 0.7 |
| | | 溶媒④ | | 4.4 | 0.8 | 1.3 | 3.8 | 3.3 | 0.6 |
| 11 | Pn-3-glc | 溶媒① | 3.0 | 11.3 | 30.7 | 11.8 | 14.0 | 13.9 | 21.4 |
| | | 溶媒④ | | 10.9 | 29.0 | 9.7 | 13.6 | 13.8 | 23.4 |
| 12 | Mv-3-gal | 溶媒① | 0.6 | 1.3 | 0.7 | 0.5 | 0.7 | 1.1 | 1.1 |
| | | 溶媒④ | | 1.2 | 0.5 | 0.3 | 0.7 | 0.9 | 0.6 |
| 13 | Pn-3-ara | 溶媒① | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| | | 溶媒④ | | 0.2 | ND | ND | 0.2 | ND | 0.4 |
| 14 | Mv-3-glc | 溶媒① | 8.6 | 8.0 | 2.8 | 7.2 | 11.5 | 7.0 | 1.0 |
| | | 溶媒④ | | 8.2 | 2.7 | 6.7 | 11.8 | 7.5 | 1.3 |
| 15 | Mv-3-ara | 溶媒① | 1.9 | 4.9 | 10.4 | 5.1 | 6.0 | 5.7 | 7.9 |
| | | 溶媒④ | | 4.8 | 9.4 | 4.1 | 5.4 | 5.2 | 5.4 |

*略号は図1を参照

**溶媒①：50%酢酸-50%エタノール 溶媒④：1%塩酸-99%メタノール

の間では $R^2=0.7116$ で高位の相関が認められた。ポリフェノール含量とラジカル吸収能 (ORAC法) の間では $R^2=0.6377$ で中位の相関が認められた。ラジカル消去能とラジカル吸収能の間では $R^2=0.6353$ で中位の相関が認められた。

考 察

抽出溶媒の検討において、抽出溶媒のpHが低いものほど高い抽出効率を示している傾向が見られた。これは、pHが低いほどアントシアニンが安定するという性質[20]が関係していると考えられる。

アントシアニン含量は野生種 (ビルベリー) がブルーベリーの栽培品種より極めて高い値を示している。ビルベリーはもともとアントシアニンの含量が多いことで知られており、そのため今回はポジティブコントロールとして使用した。また、ポリフェノール含量とアントシアニン含量の間に相関が見られなかったのは、ブルーベリーにフラボノール類や桂皮酸類など、アントシアニン以外のポリフェノールが含まれているためだと思われる。

アントシアニン組成において、デルフィニジンやシアニジンアグリコンとして持つアントシアニンは、他のものに比べて機能性が高いこと[7, 9, 10

表4. アントシアニン組成－アグリコンごとの比較 (面積%)

| 品種名 | 抽出溶媒* | アグリコン | | | | | 合計 |
|----------|-------|--------------|-----------|------------|-----------|-----------|-------|
| | | Delphinidin系 | Cyanidin系 | Petunidin系 | Peonidin系 | Malvidin系 | |
| ビルベリー | | 37.6 | 28.7 | 16.8 | 5.6 | 11.1 | 99.8 |
| 南部ハイブッシュ | | | | | | | |
| オニール | 溶媒① | 32.2 | 6.3 | 22.5 | 23.4 | 15.1 | 99.5 |
| | 溶媒④ | 34.3 | 6.3 | 21.4 | 23.2 | 14.1 | 99.4 |
| ジョージアジム | 溶媒① | 35.7 | 15.5 | 12.8 | 18.6 | 14.0 | 96.6 |
| | 溶媒④ | 35.7 | 16.4 | 13.4 | 17.1 | 14.5 | 97.1 |
| ブラッデン | 溶媒① | 30.8 | 9.1 | 21.5 | 23.3 | 11.8 | 96.5 |
| | 溶媒④ | 34.4 | 9.6 | 18.1 | 27.0 | 10.2 | 99.3 |
| パールリバー | 溶媒① | 24.5 | 17.9 | 23.1 | 24.4 | 9.7 | 99.7 |
| | 溶媒④ | 27.2 | 17.4 | 22.8 | 23.3 | 9.1 | 99.8 |
| マグノリア | 溶媒① | 40.4 | 11.8 | 14.1 | 18.4 | 15.3 | 100.0 |
| | 溶媒④ | 42.7 | 11.6 | 13.6 | 16.5 | 15.3 | 99.6 |
| シャープブルー | 溶媒① | 36.0 | 12.3 | 14.1 | 19.1 | 18.2 | 99.6 |
| | 溶媒④ | 33.9 | 11.3 | 13.7 | 20.1 | 20.7 | 99.8 |
| ラビットアイ | | | | | | | |
| ノビリス | 溶媒① | 23.3 | 25.8 | 22.3 | 14.3 | 14.2 | 100.0 |
| | 溶媒④ | 24.1 | 25.7 | 21.9 | 14.1 | 14.2 | 100.0 |
| ウッダード | 溶媒① | 23.7 | 8.2 | 19.0 | 35.2 | 13.9 | 100.0 |
| | 溶媒④ | 27.4 | 8.4 | 18.5 | 33.2 | 12.6 | 100.0 |
| オースチン | 溶媒① | 35.1 | 16.9 | 18.5 | 16.2 | 12.8 | 99.5 |
| | 溶媒④ | 41.5 | 17.2 | 16.5 | 13.3 | 11.2 | 99.7 |
| クライマックス | 溶媒① | 25.2 | 21.0 | 18.3 | 17.1 | 18.2 | 99.7 |
| | 溶媒④ | 26.0 | 21.4 | 17.9 | 16.6 | 17.9 | 99.7 |
| ティフブルー | 溶媒① | 27.0 | 21.4 | 20.4 | 17.1 | 13.8 | 99.7 |
| | 溶媒④ | 27.0 | 22.3 | 19.7 | 16.8 | 13.6 | 99.3 |
| ブライトウェル | 溶媒① | 26.2 | 15.8 | 21.5 | 25.7 | 10.1 | 99.3 |
| | 溶媒④ | 27.8 | 16.4 | 21.1 | 26.7 | 7.2 | 99.2 |

*溶媒①: 50%酢酸－50%エタノール 溶媒④: 1%塩酸－99%メタノール

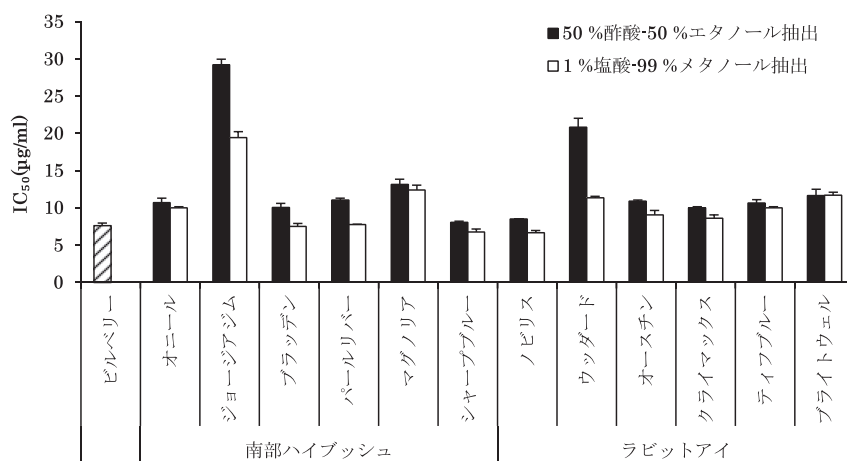


図5. ブルーベリー12品種における果実のラジカル消去能 (DPPH法)

表5. アントシアニン組成—糖鎖ごとの比較 (面積%)

| 品 種 名 | 抽出溶媒* | 糖 鎖 | | | 合 計 |
|-----------|-------|-------------|-----------|-------------|-------|
| | | galactoside | glucoside | arabinoside | |
| ビルベリー | | 37.0 | 37.0 | 25.7 | 99.8 |
| 南部種ハイブッシュ | | | | | |
| オニール | 酢酸抽出 | 39.9 | 31.4 | 28.2 | 99.5 |
| | 塩酸抽出 | 42.1 | 31.4 | 25.8 | 99.4 |
| ジョージアジム | 酢酸抽出 | 46.3 | 26.4 | 24.0 | 96.6 |
| | 塩酸抽出 | 39.9 | 34.4 | 22.8 | 97.1 |
| ブラッデン | 酢酸抽出 | 48.7 | 21.9 | 25.9 | 96.5 |
| | 塩酸抽出 | 53.8 | 27.3 | 18.2 | 99.3 |
| パールリパー | 酢酸抽出 | 57.4 | 26.5 | 15.8 | 99.7 |
| | 塩酸抽出 | 58.8 | 24.9 | 16.0 | 99.8 |
| マグノリア | 酢酸抽出 | 39.2 | 34.1 | 26.7 | 100.0 |
| | 塩酸抽出 | 40.1 | 33.3 | 26.3 | 99.6 |
| シャープブルー | 酢酸抽出 | 37.9 | 33.5 | 28.2 | 99.6 |
| | 塩酸抽出 | 36.4 | 35.0 | 28.4 | 99.8 |
| ラビットアイ | | | | | |
| ノビリス | 酢酸抽出 | 46.5 | 33.2 | 20.3 | 100.0 |
| | 塩酸抽出 | 46.6 | 33.0 | 20.4 | 100.0 |
| ウッダード | 酢酸抽出 | 43.0 | 37.7 | 19.3 | 100.0 |
| | 塩酸抽出 | 45.3 | 35.9 | 18.8 | 100.0 |
| オースチン | 酢酸抽出 | 46.8 | 29.9 | 22.8 | 99.5 |
| | 塩酸抽出 | 48.0 | 29.8 | 21.9 | 99.7 |
| クライマックス | 酢酸抽出 | 39.0 | 38.8 | 21.9 | 99.7 |
| | 塩酸抽出 | 39.3 | 39.0 | 21.5 | 99.7 |
| ティフブルー | 酢酸抽出 | 46.7 | 32.8 | 20.2 | 99.7 |
| | 塩酸抽出 | 46.0 | 34.2 | 19.2 | 99.3 |
| ブライトウェル | 酢酸抽出 | 54.4 | 28.1 | 16.7 | 99.3 |
| | 塩酸抽出 | 56.3 | 30.9 | 12.0 | 99.2 |

*溶媒①: 50%酢酸-50%エタノール 溶媒④: 1%塩酸-99%メタノール

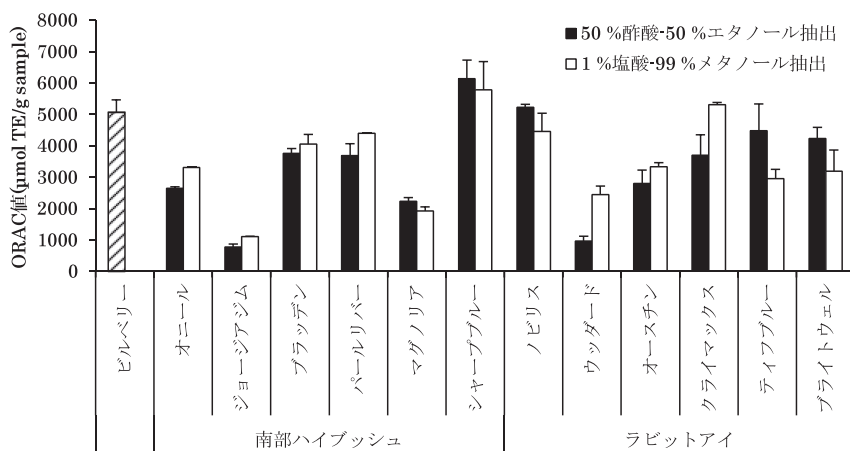


図6. ブルーベリー12品種における果実のラジカル吸収能 (ORAC法)

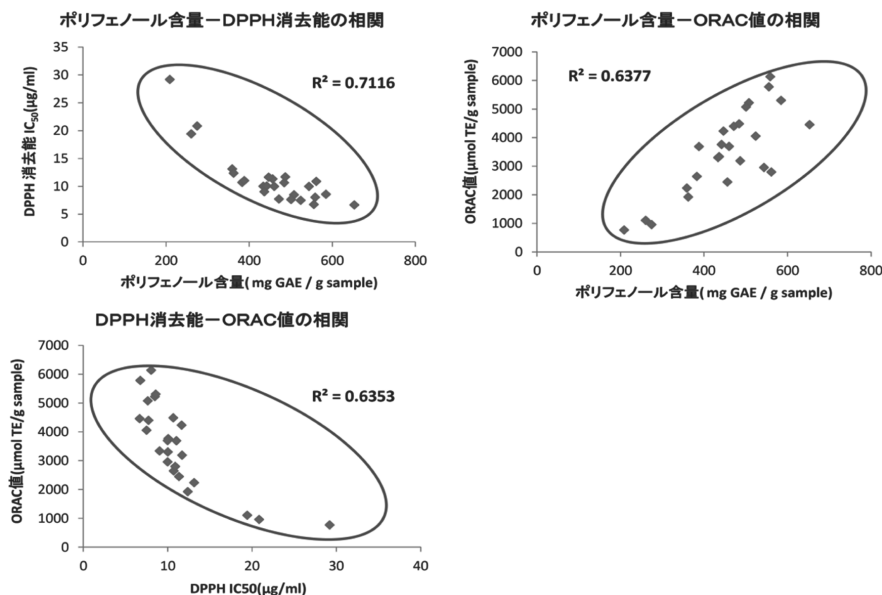


図7. ブルーベリー果実におけるポリフェノール含量, DPPH消去能, ORAC値の相関図

～12]をこれまでの研究で明らかにした。本研究で解析したブルーベリーはデルフィニジン系やシアニジン系のアントシアニンが多く含まれており、機能性食品として効果が期待できる。

本研究では抗酸化能の測定にDPPH法とORAC法を二つ用いている。DPPH法は測定が簡易で感度が高いという利点があるため、これまで食品成分の抗酸化能測定にはよく使われていたが、測定に用いる窒素ラジカル (DPPH) が生体内に存在しないことや、pH (5.5) や温度 (室温) などの反応条件が生体内と異なることが障壁になっている。一方、ORAC法に用いられるラジカルは生体内にも存在しているペルオキシラジカル (ROO^+) で、pH (7 付近) や温度 (37℃) も生体内に近い反応条件である。また、従来の測定法では困難だった水溶性・脂溶性のサンプルを測定することも可能となった。従って、ORAC法はアメリカ農務省 (USDA) で既に食品の抗酸化能を評価する標準指標として採用されている。日本でもORAC法を推奨しており、ORAC値を標記した飲料などが販売されている。一方、ORAC法で用いられるラジカル発生剤 (AAPH) は温度感受性が非常に高く、溶媒に溶かしてから一日程度しか品質が維持出来ないため、使用時調整をすることを推奨する。また、反応温度が結果に影響を及ぼすので、マルチプレート内で温度を均一にす

る必要がある。

引用文献

- [1] Bao L, Yao XS, Yau CC, Tsi D, Chia CS, Nagai H, Kurihara H. *J Agric Food Chem*, 56, 7803-7807 (2008)
- [2] Canter PH, Ernst E. *Surv Ophthalmol*, 49, 38-50 (2004)
- [3] Chen J, Uto T, Tanigawa S, Kumamoto T, Fujii M, Hou DX. *Nutr Cancer*, 60S, 43-50 (2008)
- [4] Cooke D, Schwarz M, Boocock D, Winterhalter P, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH. *Int J Cancer*, 119, 2213-2220 (2006)
- [5] Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X. *J Biol Chem*, 281, 17359-17368 (2006)
- [6] Fuentealba J, Dibarrart AJ, Fuentes-Fuentes MC, Saez-Orellana F, Quiñones K, Guzmán L, Perez C, Becerra J, Aguayo LG. *J Neurosci Res*, 89, 1499-1508 (2011)
- [7] 侯 徳興：ビルベリーのアントシアニンと機能性, *FOOD Style* 21, 10, 31-35 (2006)
- [8] Hou DX. *Current Mol Med*, 3, 149-159 (2003)
- [9] Hou DX, Fujii M, Terahara N, Yoshimoto M. *J Biomed Biotech*, 5, 321-325 (2004)
- [10] Hou DX, Kai K, Li JJ, Lin SG, Terahara N, Wakamatsu M, Fujii M, Young MR, and Colburn N. *Carcinogenesis*, 25, 29-36 (2004)
- [11] Hou DX, Ose T, Lin S, Harazoro K, Imamura I, Kubo M, Uto T, Terahara N, Yoshimoto M, Fujii M. *Int J Oncol*, 23, 705-712 (2003)

-
- [12]Hou DX, Yanagita T, Uto T, Masuzaki S, Fujii M. *Biochem. Pharmacol*, **70**, 417-425 (2005)
- [13]Ichiyanagi T, Shida Y, Rahman MM, Hatano Y, Konishi T. *J Agric Food Chem*, **54**, 6578-6587 (2006)
- [14]Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. *J Agric Food Chem*, **49**, 4076-4082 (2001)
- [15]Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SA, Graf BA, O'Leary JM, Milbury PE. *J Agric Food Chem*, **56**, 705-712 (2008)
- [16]Kay CD, Mazza G, Holub BJ, Wang J. *Br J Nutr*, **91**, 933-942 (2004)
- [17]Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. *J Agric Food Chem*, **51**, 3273-3279 (2003)
- [18]Prior RL, Wu X, Gu L, Hager TJ, Hager A, Howard LR. *J Agric Food Chem*, **56**, 647-53 (2008)
- [19]Rendeiro C, Vauzour D, Kean RJ, Butler LT, Rattray M, Spencer JP, Williams CM. *Psychopharmacol*, **223**, 319-330 (2012)
- [20]津田孝範・須田郁夫・津志田藤二：アントシアニンの科学－生理機能・製品開発の新展開－. 建帛社, 東京 (2009)
- [21]Tsuda T, Ueno Y, Yoshikawa T, Kojo H, Osawa T. *Biochem Pharmacol*, **71**, 1184-1197 (2006)
- [22]Williams CM, El Mohsen MA, Vauzour D, Rendeiro C, Butler LT, Ellis JA, Whiteman M, Spencer JP. *Free Radic Biol Med*, **45**, 295-305 (2008)
- [23]Zhang J, Lazarenko OP, Blackburn ML, Shankar K, Badger TM, Ronis MJ, Chen JR. *PLoS One*, **6**, e24486 (2011)

Analysis of antioxidant capacity and anthocyanin composition among the cultivars of blueberry (*Vaccinium* spp.)

Junpei IRIZUMI¹⁾, Takayuki SOGO¹⁾, Kozue SAKAO¹⁾, Masashi YAMAMOTO²⁾,
Hiroyasu FUKUDOME³⁾, Shoji KAWAGUCHI³⁾, Shigeto TOMINAGA²⁾, De-Xing HOU^{1)†}

(¹⁾Laboratory of Function Food and Nutrigenomics, (²⁾Laboratory of Fruit Science,

³⁾Toso Orchard of Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
Korimoto 1-21-24, Kagoshima City, 890-0065 Japan)

Summary

Blueberry (*Vaccinium* spp.) contains higher amounts of anthocyanins and is reported to be benefit to human health. On the other hand, there are differences on amounts and compositions of anthocyanins among the cultivars of blueberry, which concerns the functionality. In the present study, we first examined the extract-efficiency of the anthocyanins with the solvents available for food utilization, and then investigated anthocyanin compositions and antioxidant capacity (DPPH and ORAC) in 12 cultivars of blueberry cultivated in the Toso Orchard, Experimental Farm of the Faculty. The results revealed that the solvent consisting of 50% acetic acid - 50% ethanol showed the same extract efficiency as that with the solvent of 1% hydrochloric acid - 99% methanol, a classic solvent for anthocyanin extracts but not available for food utilization. There are no significant differences on the contents of polyphenols and anthocyanins, and antioxidant capacity except Georgiagem blueberry showed the lower activity. Moreover, positive correlations of middle to high degree were observed between the polyphenol content and the antioxidant capacity.

Key words: Blueberry, Anthocyanin, HPLC, DPPH, ORAC.

†: Correspondence to: De-Xing HOU (Laboratory of Function Food and Nutrigenomics)

Tel/Fax: 099-285-8649, E-mail: hou@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp