

フォトダイオードアレイ検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによるアントシアニンの同定と薄層クロマトグラフィーおよび分光光度計での吸収スペクトル特性を併用したアントシアニンの同定の比較

立澤文見^{1*}・篠田浩一²

¹ 拓殖大学北海道短期大学 074-8585 深川市メム

² 農業・生物系特定産業技術研究機構北海道農業研究センター 062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘

Comparison between Identification of Anthocyanin by HPLC Analysis with a Photodiode Array Detector and that Using TLC Combined with UV-VIS Spectral Analysis.

Fumi Tatsuzawa^{1*} and Koichi Shinoda²

¹ Hokkaido Junior College, Takushoku University, Fukagawa 074-8585

² National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Sapporo 062-8555

Summary

Properties of nine kinds of anthocyanidins and 24 kinds of anthocyanins were compared by thin-layer chromatography (TLC) data and UV-VIS spectrophotometer data with high performance liquid chromatography (HPLC) data including photo diode array (PDA) detector data. The measuring time is about one hour with HPLC analysis though it takes over twelve hours using TLC combined with UV-VIS measurement. Moreover, it is possible to analyze even by a small amount of material using the HPLC analysis, and the efficiency is also high. In addition, absorption spectrum measurement is possible using PDA at the same time. In this study, spectrum data obtained with a PDA detector, which is expected to increase the efficiency of the identification of anthocyanin by HPLC analysis, was presented.

キーワード： アントシアニン, アントシアニン, 高速液体クロマトグラフィー, フォトダイオードアレイ検出器

緒言

アントシアニンの同定には、濾紙クロマトグラフィー(PC)や薄層クロマトグラフィー(TLC)の R_f 値とともに弱酸性(0.1%塩酸性)メタノール中での吸収スペクトル特性が用いられている。近年では、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)での保持時間(t_R)も同定のための一要素として使われるようになり、PCやTLCより高い分解能が得られ、分析レベルもあがっている。さらに、最近ではHPLC分析においてフォトダイオードアレイ(PDA)検出器を用いて、各アントシアニンピークごとの吸収スペクトルを比較することも可能になった(Andersen, 1985)。この結果、 t_R の近いアントシアニンでも可視部吸収スペクトルの可視部吸収極大波長の差により判別が容易にな

った。

これまでに、アントシアニンのPCやTLCの R_f 値や弱酸性メタノール中での吸収スペクトルに関するデータは多くの論文で示されており、集約された代表的な資料として、PCの R_f 値データはHarborne(1967)のもの、弱酸性メタノール中での吸収スペクトルデータはHarborne(1958)のものがあげられる。しかし、PDA検出器を用いたHPLC分析で多くのアントシアニンを同時に比較した報告は無い。そこで本研究では、最近新たに発見したアントシアニンを含め、基本的なアントシアニンおよびアントシアニンでのHPLC分析の t_R および吸収スペクトル特性を調査するとともに、従来の方法によるデータを並記し、アントシアニンの同定の簡易化について検討した。

材料および方法

1. 供試材料

測定のためのアントシアニンは、*Tulipa* (朱赤色系品種

2004年7月20日 受付. 2004年12月16日 受理.

* Corresponding author.

E-mail: tatsuzawa@takushoku-hc.ac.jp

‘Oxford’)からペラルゴニジン 3-グルコシド, ペラルゴニジン 3-ルチノシド (Tatsuzawa ら, 2003), *Rosa* (赤色系品種 ‘Red Meilandina’)からペラルゴニジン 3, 5-ジグルコシド, シアニジン 3, 5-ジグルコシド, ペオニジン 3, 5-ジグルコシド (Mikanagi ら, 2000), *Cymbidium* (暗紫色系品種 ‘Eicho’)からシアニジン 3-グルコシド, シアニジン 3-ルチノシド, ペオニジン 3-グルコシド, ペオニジン 3-ルチノシド (Tatsuzawa ら, 1996), *Alstroemeria* (赤紫色系品種 ‘Westland’)からデルフィニジン 3-グルコシド, デルフィニジン 3-ルチノシド, 6-ヒドロキシシアニジン 3-グルコシド, 6-ヒドロキシシアニジン 3-ルチノシド, 6-ヒドロキシデルフィニジン 3-グルコシド, 6-ヒドロキシデルフィニジン 3-ルチノシド (Tatsuzawa ら, 2002), *Alstroemeria* (黄赤色系品種 ‘スポッティレッド’)から6-ヒドロキシペラルゴニジン 3-グルコシド, 6-ヒドロキシペラルゴニジン 3-ルチノシド (Tatsuzawa ら, 2003), *Trenia fournieri* (紫色系品種)からデルフィニジン 3, 5-ジグルコシド, ペチュニジン 3, 5-ジグルコシド, マルビジン 3, 5-ジグルコシド (Aida ら, 2000), および *Liriope platyphylla* の種皮からペチュニジン 3-グルコシド, マルビジン 3-グルコシド, ペチュニジン 3-ルチノシド, マルビジン 3-ルチノシド (Ishikura・Sugahara, 1979)をそれぞれ TLC や HPLC の分取により調製したものをを用いた。アントシアニンはそれぞれのアントシアニンを 2N HCl に溶かし, 100°C の沸騰浴中で 2 時間加水分解したものをを用いた。

2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析

HPLC 分析は, LC-10AVP HPLC システム (Shimadzu) を用い, 以下の条件で行った。カラム: Waters C₁₈ カラム (4.6 φ × 250 mm), カラム温度: 40°C, 移動層: A 液 (1.5% リン酸), B 液 (1.5% リン酸, 20% 酢酸, 25% アセトニトリル), 濃度勾配: B 液 20-85% (40 min), 流速: 1.0 ml/min, 検出波長: 200 - 700 nm (フォトダイオードアレイ検出器; SPD-M10AVP)。

3. 薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析

TLC 分析は, セルロース薄層板 (20 × 20 cm, Merck 製) に試料を点着し, 室温 20°C で上昇法により展開した。展開溶媒は, アントシアニンに Forestal (酢酸: 塩酸: 水 = 30:3:10), アントシアニンには BAW (*n*-ブタノール: 酢酸: 水 = 4:1:2, v/v/v), BuHCl (*n*-ブタノール: 2N 塩酸 = 1:1, v/v, 上層), 1% HCl (塩酸: 水 = 3:97, v/v) および AHW (酢酸: 塩酸: 水 = 15:3:82, v/v/v) を用いた。さらに, それぞれの展開溶媒において, 分析に必要なおよその時間を測定した。

4. 分光光度計による吸収スペクトルの測定

各色素を石英セル内で 0.1% 塩酸性メタノールに溶解し, 分光光度計 (Shimadzu MPS-2400) で吸収スペクトル (200 - 700 nm の範囲) を測定した。そして, 吸収極大波長 (λ_{\max} (nm)) および E_{440}/E_{\max} (%) (可視部吸収極大

値の吸光度に対する 440 nm での吸光度の割合で, アントシアニンの 5 位の水酸基におけるグリコシル化の有無の判定ができる (Harborne, 1958)) を求めた。また, 塩化アルミニウムによる可視部吸収極大の移動の有無も調べた。

結 果

1. アントシアニン

本研究で用いた色素は 9 種類のアントシアニンが基本骨格であり, これらのアントシアニンを Forestal で TLC した結果を第 1 表に示した。それぞれ既知物質からのアグリコンであり, スポットの色と R_f 値から十分に判別ができた。

2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析

全試料の HPLC 分析の結果, 10.23 - 33.01 分の範囲に全てのピークが検出され, 各ピークでの吸収スペクトルカーブを調べたうえで λ_{\max} (nm) と E_{440}/E_{\max} (%) を示した (第 1 表)。HPLC 分析での可視部 λ_{\max} (nm) は弱酸性メタノール中での値より 7 - 21 nm 短く, 1 - 4% 減の値を示した (第 1 表)。

3. 薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析

TLC 分析には BAW または BuHCl を展開溶媒とした場合, 約 5 時間, AHW または 1% HCl を展開溶媒とした場合, 約 2 時間を要した。それぞれの R_f 値を Harborne (1967) の PC 分析と比較した結果, 記載のない 6-ヒドロキシアントシアニンを除いて全体的に R_f 値の低くなる傾向が見られた。

4. 分光光度計による吸収スペクトル測定

弱酸性メタノール中でのアントシアニンおよびアントシアニンのスペクトル特性を Harborne (1958) と比較した結果, 記載のない 6-ヒドロキシアントシアニンとペオニジン, ペチュニジンおよびマルビジン 3-ルチノシドを除いて可視部 λ_{\max} (nm) は 1-7 nm の差が見られるものの E_{440}/E_{\max} (%) や塩化アルミニウムに対する反応を含め, 全体的に同じ傾向であった (第 1 表)。

考 察

TLC でアントシアニンの同定を行う場合, BAW や BuHCl で 20 cm 展開するために約 5 時間かかり, さらに 2 次元展開する場合 AHW や 1% HCl の約 2 時間が加わり 7 時間以上を要した。検体に夾雑物が多い場合やアントシアニン組成が複雑な場合は, 上記のブタノール系溶媒と水系溶媒で計 7 時間かけて精製してから分析する必要がある。よって, 精製 7 時間 + 分析 5 時間 (BAW, BuHCl, AHW と 1% HCl を同時に展開した場合) = 12 時間が最低でも必要になると考えられた。特に, 分光光度計での測定には精製したアントシアニンを用いないと測定ができないため, 最低でも 7 時間以上かかることになる。これら従来の方法でアントシアニンを同定するためには少なくとも半日は必要であり, さらに精製のために多量の材料

第1表 アントシアニンとアントシアニンのクロマトおよびスペクトル特性

色素 ²	HPLC			分光光度計(0.1%塩酸性メタノール中)			TLCのR _f 値(x100)				
	λ_{max} ^y	E_{440}/E_{max} (%) ^y	ϵ_R	λ_{max}	E_{440}/E_{max} (%)	AlCl ₃	Forestal	BAW	BuHCl	1%HCl	AHW
Pg	513,422,267	30	28.08	525,(426),276	35	0	65				
Pg 3-glc	502,428,275,268	44	18.50	510,(432),275	41	0		40	14	7	23
Pg 3-rut	503,430,277,269	43	20.08	511,(433),277	40	0		39	17	17	40
Pg 3,5-diglc	500,275	24	15.03	507,267	21	0		26	3	14	40
Cy	526,274	23	23.93	536,273	44	+	42				
Cy 3-glc	517,279	31	16.26	528,282	27	+		25	8	6	16
Cy 3-rut	517,280	31	17.68	530,280	25	+		24	8	9	26
Cy 3,5-diglc	514,277	16	12.50	526,270	16	+		15	2	8	25
Dp	531,272	23	19.43	547,277	18	+	23				
Dp 3-glc	524,276	28	14.19	541,280	18	+		19	4	2	6
Dp 3-rut	526,277	27	15.56	543,277	18	+		18	6	5	16
Dp 3,5-diglc	522,274	15	10.23	538,274	14	+		11	1	5	17
Pn	528,270	25	31.86	537,275	32	0	60				
Pn 3-glc	518,279	31	20.61	528,280	28	0		34	16	7	19
Pn 3-rut	518,280	29	21.99	528,279	29	0		30	7	10	34
Pn 3,5-diglc	516,276	16	16.30	524,278	13	0		23	2	11	21
Pt	532,272	23	26.24	547,272	20	+	39				
Pt 3-glc	526,276	26	18.14	540,279	20	+		22	5	2	9
Pt 3-rut	528,277	27	19.40	542,277	18	+		22	7	4	26
Pt 3,5-diglc	524,274	15	14.61	537,274	12	+		16	1	5	18
Mv	535,272	23	33.01	547,276	23	0	56				
Mv 3-glc	528,277	25	22.23	538,280	21	0		24	6	2	12
Mv 3-rut	530,277	26	23.57	539,282	24	0		22	7	5	26
Mv 3,5-diglc	526,276	14	17.83	536,275	12	0		22	1	7	28
6OHPg	491,283	42	23.90	500,272	37	0	45				
6OHPg 3-glc	484,287	48	15.48	493,270	41	0		17	5	3	14
6OHPg 3-rut	484,285	47	16.97	493,271	38	0		21	5	9	29
6OHCy	504,279	30	19.50	523,248	20	+	26				
6OHCy 3-glc	499,282	34	13.04	513,283	24	+		8	2	3	8
6OHCy 3-rut	500,282	33	15.10	514,284	23	+		9	4	4	16
6OHDp	511,279	28	15.74	532,283	15	+	12				
6OHDp 3-glc	507,279	30	11.08	525,280	21	+		2	1	1	3
6OHDp 3-rut	509,279	30	12.54	525,279	17	+		4	1	2	9

²Pg: ベラルゴニン, Cy: シアニン, Dp: デルフィニン, Pn: ペオニン, Pt: ベチニン, Mv: マルビン, 6OHPg: 6ヒドロキシベラルゴニン, 6OHCy: 6ヒドロキシシアニン, 6OHDp: 6ヒドロキシデルフィニン, glc: グルコシド, rut: ルチノシド, diglc: ジグルコシド

^yフォトダイオードアレイ(PDA)検出器で測定

が必要である。しかし、HPLC分析の場合、感度の高さから少量の材料で済み、1回の測定が約1時間で終わる。夾雑物を7時間かけて取り除いたとしても約8時間で終わる。アントシアニンの可視部吸収極大領域での夾雑物の影響は少ないことが多い(Harborne, 1973)ので、植物材料から抽出後の未精製材料でも約1時間の測定で1検体が終わる。さらに、PDA検出器を使うことにより各ピークの吸収スペクトルを同時に測定することが可能である。HPLC分析でのPDA検出器で測定した吸収スペクトルから計算する E_{440}/E_{max} (%)は、弱酸性メタノール中での吸収スペクトルから計算する E_{440}/E_{max} (%)と大きな差はなかった。さらに、アントシアニンの5位の水酸基に糖が結合している場合、 E_{440}/E_{max} (%)の値が低くなる(Harborne, 1958)傾向も確認できた。しかし、両者の可視部 λ_{max} (nm)には差があり、全体としてHPLC分析では波長が僅かに短くなる傾向が見られた。このことは、色素が溶けている溶媒の違いが原因と考えられた。しかし、本研究と同じ分析条件にすれば各アントシアニンの可視部 λ_{max} (nm)は特有の値として考えられることから、第1表のHPLCデータを用いることにより今後のアントシアニン同定はこれまで以上に効率が良くなると考えられた。また、時間はかかってしまうが、従来のデータも併用して分析することにより同定の精度は増すと考えられ

た。

これまでに、高等植物のアントシアニンはアントシアニンを含め約600種類のもの知られている(Harborne・Baxter, 1999; Harborne・Williams, 1998, 2001)。本研究で用いた色素は33種類で、全体の約5.5%程度である。しかし、斎藤ら(1991)に記載されている669属の種子植物において、本研究に用いたアントシアニンの出現頻度は、rha-gluという表記(斎藤ら, 1991)をルチノースに含めると、70%以上の属におよぶ。よって、本研究の成果は今後の園芸植物のアントシアニン分布分析においても有効な知見になると考えられた。

摘 要

9種類のアントシアニンと24種類のアントシアニングリコシドの特性を、薄層クロマトグラフィー(TLC)と分光光度計による測定結果と、フォトダイオードアレイ(PDA)検出器を使った高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による測定結果と比較した。TLCや分光光度計による分析は測定に12時間以上かかるのに対し、HPLC分析は約1時間で終わる。また、HPLC分析では少量の材料でも分析が可能で、効率も良い。さらに、PDAを使うことにより、同時に吸収スペクトルの測定が可能である。そこで本研究では、HPLC分析によるアントシアニ

ンの同定の効率をさらに増すと考えられる PDA 検出器で得られるスペクトルデータをまとめた。

引用文献

- Aida, R., K. Yoshida, T. Kondo, S. Kishimoto and M. Shibata. 2000. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Sci.* 160: 49-56.
- Andesen, Ø. M. 1985. Chromatographic Separation of anthocyanins in cowberry (Lingonberry) *Vaccium vites-idaea* L. *J. Food Sci.* 50: 1230-1232.
- Harborne, J. B. 1958. Spectral Methods of Characterizing Anthocyanins. *Biochem. J.* 70: 22-28.
- Harborne, J. B. 1967. Comparative Biochemistry of Flavonoids. p. 1-36. Academic Press, London.
- Harborne, J. B. 1973. Phytochemical Methods. p. 1-32. Chapman and Hall, London.
- Harborne, J. B. and H. Baxter. 1999. The Handbook of Natural Flavonoids, Volume 2. p. 1-114. John Wiley & Sons, Chichester.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams. 1998. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 15: 631-652.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams. 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 18: 310-333.
- Ishikura, N. and K. Sugahara. 1979. A survey of anthocyanins in fruits of some angiosperms, II. *Bot. Mag. Tokyo* 92: 157-161.
- Mikanagi, Y., N. Saito, M. Yokoi and F. Tatsuzawa. 2000. Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae* (=Rosa), *Chinensis*, *Gallicanae*, and some modern garden roses. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 887-902.
- 斎藤規夫・榎世宝・御巫由紀. 1991. 高等植物におけるAnthocyaninの分布. *明治学院論叢.* 486: 41-128.
- Tatsuzawa, F., N. Saito and M. Yokoi. 1996. Anthocyanins in the flowers of *Cymbidium*. *Lindleyana* 11: 214-219.
- Tatsuzawa, F., N. Saito, N. Murata, K. Shinoda, A. Shigihara and T. Honda. 2002. Two novel 6-hydroxyanthocyanins in the flowers of *Alstroemeria* 'Westland'. *Heterocycles* 57: 1787-1792.
- Tatsuzawa, F., N. Saito, N. Murata, K. Shinoda, A. Shigihara and T. Honda. 2003. 6-Hydroxypelargonidin glycosides in the orange-red flowers of *Alstroemeria*. *Phytochem.* 62: 1239-1242.