

高規格化乾燥処理技術確立と地産外商向け乾燥素材の研究 開発(2)

誌名	高知県工業技術センター研究報告 = Reports of Kochi Prefectural Industrial Technology Center
ISSN	09168729
著者名	森山,洋憲 下藤,悟 島崎,雅哉
発行元	高知県工業技術センター
巻/号	45号
掲載ページ	p. 18-23
発行年月	2014年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



高規格化乾燥処理技術確立と地産外商向け乾燥素材の研究開発（第2報）

LC-MSによる冷風乾燥ブルーベリーのアントシアニン解析

森山洋憲 下藤 悟 島崎雅哉*

Study of drying technique for foods produced in Kochi Pref. (Part II)

LC-MS analysis of anthocyanins in dried blueberry by low temperature air drying

*Hironori MORIYAMA Satoru SHIMOFUJI Masaya SHIMASAKI**

冷風乾燥機を用いて乾燥されたブルーベリーに含まれているアントシアニンを解析した。アントシアニン解析には質量分析計付き高速液体クロマトグラフ (LC-MS) 装置を使用した。標準物質を使用した LC-MS 分析条件の設定後、冷風乾燥試料からアントシアニン色素を抽出し、LC-MS 装置に注入した。試料として用いたラビットアイブルーベリー (*V. Ashei Reade*) から、デルフィニジン、シアニジン、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジンの各配糖体が 11 種類検出された。冷風乾燥後の試料は乾燥前に比べて約 1.8 倍高い値を示し、総アントシアニン量 8.11 mg/g であった。

1. 目的

ブルーベリーはツツジ科スノキ属 (*Vaccinium*) に属し、ラビットアイ (*V. Ashei Reade*)、ハイブッシュ (*V. corymbosum* L. 等)、ローブッシュ (*V. angustifolia*) の 3 種に分類される。平成 23 年産特産果樹生産動態等調査¹⁾によると、高知県におけるブルーベリーの栽培面積は 3.9 ha、収穫量は 6.1 t であり、全国 37 位の生産量である。ブルーベリーは、特に目立った県生産品ではないものの、その特徴的な色が食品開発に適していることから、大豊町等で生産増に向けた取り組みが行われている²⁾。

ブルーベリーに含まれている特徴的な紫色の色素成分はアントシアニンである (図 1)。ハイブッシュブルーベリー品種では 8~14 種類、ラビットアイブルーベリー品種では 8~11 種類のアントシアニンが検出されている³⁾。他方でブルーベリーアントシアニンはいくつかの生体調節機能を有することが知られている。例えば視力改善作用⁴⁾、抗酸化作用⁵⁾、糖尿病性網膜症に対する作用⁶⁻⁷⁾、脳の老化作用⁸⁾、動脈硬化リスク軽減効果⁹⁾が報告されている。内皮依存性血管弛緩による血圧降下作用¹⁰⁾、あるいは疲労回復作用¹¹⁾についても研究が行われている。アントシアニンは生体調節機能を示す有用な成分である一方で、安定性が低いために、加工によって変化することも知られている¹²⁻¹³⁾。

県産ブルーベリーを活用した食品開発例のひとつと

して、ドライフルーツの開発が挙げられる。しかしながら乾燥工程と、ブルーベリーアントシアニンの変化との間の関連について調べた例はない。そこで本研究では、乾燥工程のブルーベリー色素への影響について基礎的知見を得ることを目的とし、冷風乾燥されたブルーベリーに含まれているアントシアニンを調べることとした。約 10 種類のアントシアニン解析には、質量分析が有効であると判断し、質量分析計を備えた高速液体クロマトグラフ (LC-MS) 装置を用いた。

2. 方法

2. 1 試料

島崎商事(株) (佐川町) で生産されているラビットアイブルーベリーを試料として用いた。試料は冷凍品として入手し、乾燥試験直前まで冷凍保存した。冷蔵庫内での一晩放置によって解凍したものを乾燥試験に使用した。

2. 2 試薬

標準物質として(株)常盤植物化学研究所製のデルフィニジン-3-グルコシド (Dp-3-glc)、シアニジン-3-グルコシド (Cy-3-glc)、ペチュニジン-3-グルコシド (Pt-3-glc)、ペオニジン-3-グルコシド (Peo-3-glc)、マルビジン-3-グルコシド (Mv-3-glc) の各塩化物を使用した。

2. 3 乾燥

ブルーベリーの乾燥には、冷風乾燥機 (ユニマック

* 島崎商事株式会社

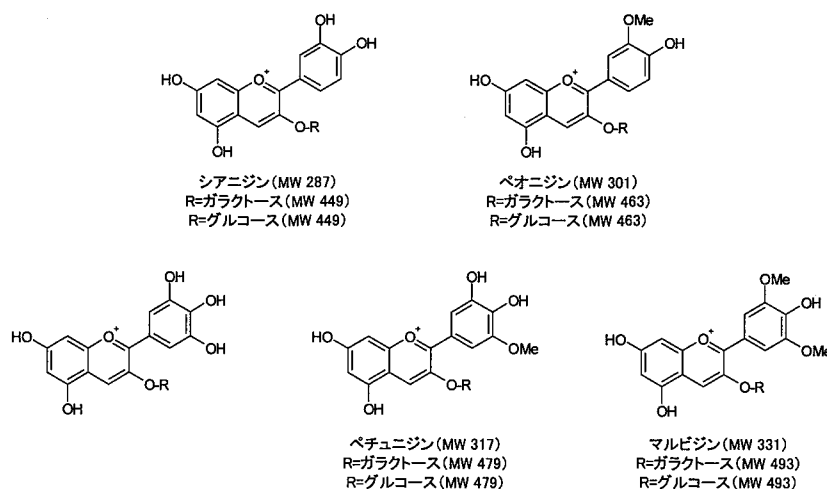


図1 ブルーベリーアントシアニンの構造式

製 DV-5P) を使用した。温度を 40°C による 1 段階の連続運転条件に設定後、オゾン灯スイッチを ON に設定した。続いて攪拌送風機の出力目盛を最大値 (200 W) に調整し、22 時間の乾燥を行った。乾燥庫内にサーモレコーダー TR-77Ui (株T&D) を設置することにより、庫内の温度と湿度の両変化をモニタリングした。

2. 4 色素抽出

ブルーベリーアントシアニンの抽出条件は、寺原らの方法¹⁴⁾を参考にして次のように行った。

ギ酸 4 mL、アセトニトリル 100 mL、Milli-Q 水 896 mL の割合で混合した液を抽出溶媒として用いた。試料 5 g に抽出溶媒 50 mL を添加し、均質化した。均質化した試料を遠沈管に移し、遠心分離 (946 ×g、10 分間) 後、上清を回収した。残さには抽出溶媒 50 mL を添加し、遠心分離によって上清を回収した。同じ遠心分離操作を繰り返し、合計 3 回分の上清を得た。3 回分の上清を合一し、200 mL にメスアップしたものを色素抽出液とした。色素抽出液をポアサイズ 0.45 μm のフィルターに通過させた後、LC-MS 装置に注入した。

2. 5 LC-MS 解析

2. 5. 1 LC 部条件

装置: Agilent 1100、カラム: Synergi 4μ MAX-RP80A φ2.00×150 mm、溶媒 A: 5%ギ酸 (v/v)、溶媒 B: 5%ギ酸 (v/v) を含むアセトニトリル、グラジエント条件: 0分 (10%B) →15分 (15%B) →25分 (20%B) →30分 (50%B)、流速: 毎分 0.2 mL、検出波長: 520 nm、カラム温度: 30°C、注入量: 2 μL

2. 5. 2 MS 部条件

装置: ABSCIEX API 2000、イオン化モード: ESI

positive、スキャンタイプ: Q1 MS (m/z 250-550)、Curtain Gas: 20 psi、Ion Source Gas1: 50 psi、Ion Source Gas2: 80 psi、Ion Spray Voltage: 5500、Temperature: 400°C

3. 結果と考察

3. 1 ブルーベリー乾燥

解凍したブルーベリーを冷風乾燥庫内に置き、22 時間の冷風乾燥試験を行った。乾燥試験を行った当日の室温は 19°C、湿度 80.3% であった。乾燥庫内の温度は、乾燥開始時に室温と同じく 19°C を示し、その後約 1 時間で装置設定温度である 40°C に上昇した (図 2)。また乾燥機に組み込まれている除湿機の霜取が作動するタイミングで 1~5°C 低下した。こうした低下は 2 時間間隔で発生し、乾燥開始後 6 時間まで確認された。6 時間以上経過した時間帯では温度低下が見られなかった。一方、乾燥庫内の湿度は、乾燥開始時に実験室湿度と同等の値を示した後、約 1 時間で約 15% に低下した。温度変化と同様に霜取のタイミングで湿度が上昇し、15~55% の範囲で変化した。霜取作動の影響について、6 時間以上の時間帯では温度変化が見られなかったのに対し、湿度変化は 22 時間の乾燥時間中約 2 時間間隔で確認された。

3. 2 LC-MS 分析条件設定

5 つの標準物質を 0.1 mg/mL に調製し、LC-MS 装置に注入した。波長 520 nm で検出したところ保持時間 4.07 分、5.94 分、7.21 分、10.18 分、11.81 分にピークがそれぞれ検出された (図 3)。また MS 検出器によるイオンクロマトグラム上にもほぼ同じ保持時間で 5 つのピークが検出された。これらピークについて保持時間

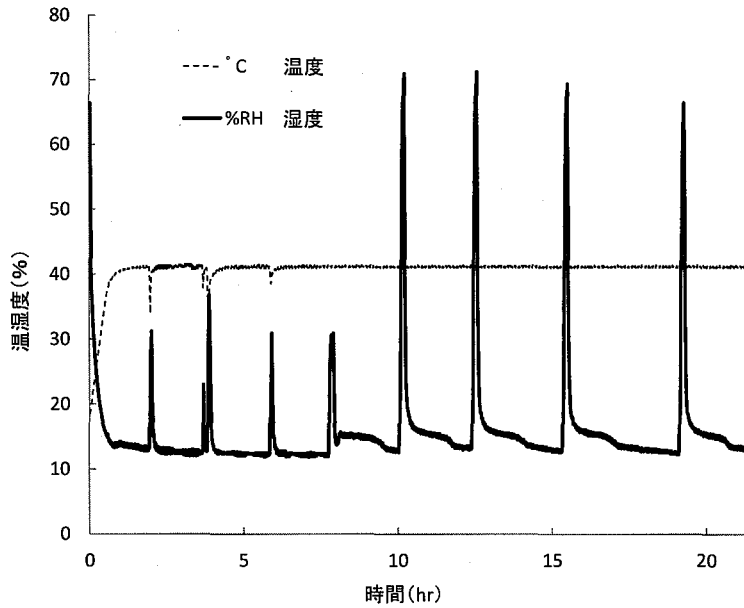


図2 ブルーベリー乾燥中の冷風乾燥庫内の温湿度変化

の短いものからアルファベットを順番に付け、ピーク A~E とした。まずピーク A の MS スペクトルを調べた (図4)。その結果、ピーク A から主分子イオンピークとして $m/z=465$ 、副分子イオンピークとして $m/z=303$ を検出した。前者の m/z は標準物質である Dp-3-glc の分子量に一致し、後者の値はアグリコンであるデルフィニジンの分子量に一致した。副分子イオンピークは主ピークのフラグメントとして検出されたものと予想する。したがってピーク A は Dp-3-glc である判断した。他のピークについても MS スペクトルを解析した結

果、ピーク B は 449 と 287、ピーク C は 479 と 317、ピーク D は 463 と 301、ピーク E は 493 と 331 をそれぞれ検出した。これらの解析値から、ピーク B~E は順に Cy-3-glc、Pt-3-glc、Peo-3-glc、Mv-3-glc であると判断した。また副分子イオンピークの m/z は各アントシアニンのアグリコンの分子量に一致することも確認した。

3. 2 乾燥品の色素解析

冷風乾燥されたブルーベリーから色素抽出物を調製

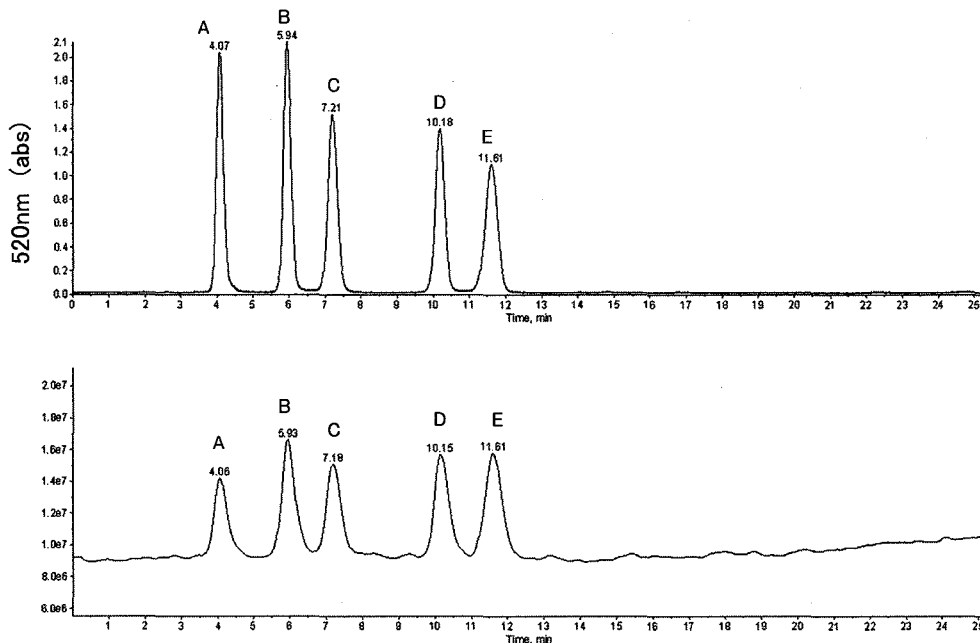


図3 標準物質の LC-MS クロマトグラム

上段：検出波長 520nm によるクロマトグラム、下段：MS 検出器によるトータルイオンクロマトグラム

し、LC-MS 装置に注入した。波長 520 nm で検出したところ、保持時間 3.67 分、4.10 分、5.13 分、6.07 分、6.28 分、7.28 分、8.79 分、10.22 分、11.76 分、13.56 分にピークが出現した (図 5)。これらピークに保持時間の短い方から順番に番号を付与し、ピーク 1~10 とした。

各ピークの MS スペクトルを調べたところ、 $m/z=463$ ~493 の分子イオンピークを検出した。図 3 で示した標準物質の保持時間と一致したことから、 $m/z=465$ の MS スペクトルが得られたことにより、ピーク 2 は Dp-3-glc であると推定した。ピーク 1 は、ピーク 2 よりも短い保持時間でありながら、 $m/z=465$ の分子イオンピークを示した。石川らは、ブルーベリーエキスの LC-MS 解析により、 $m/z=465$ を示す物質としてデルフィニジンのグルコース配糖体 (Dp-3-glc) とガラクトース配糖体 (Dp-3-gal) を検出し、ガラクトース配糖体の方がグルコース配糖体よりも短い保持時間で溶出されることを報告している¹⁵⁾。この報告が示す MS スペクトルの値と溶出順序から、ピーク 1 は Dp-3-gal であると予想した。

ピーク 4 と 6 についてもピーク 2 と同様に、標準物質の保持時間及び MS スペクトルの解析値を用いて考察した。その結果、ピーク 4 は Cy-3-glc、ピーク 6 は Pt-3-glc であると推定した。またピーク 3 と 5 についてはピーク 1 と同様に考察した。すなわち石井らの報告¹⁵⁾を参考にして、ピーク 3 はシアニジンのガラクトース配糖体 (Cy-3-gal)、ピーク 5 はペチュニジンのガラクトース配糖体 (Pt-3-gal) であると予想した。

ピーク 8 は標準物質である Peo-3-glc と同じ保持時間を示していた。このピークの MS スペクトルを調べたところ、 $m/z=493$ と 463 とを検出した。また前者の分子イオンピークの面積は后者のピーク面積の 10 倍であった。したがってピーク 8 は $m/z=493$ の物質と $m/z=463$ の物質とを 10:1 の割合で含むことが分かった。保持時間と分子量との一致により、ピーク 8 の副成分は Peo-3-glc であると推察した。一方、ピーク 9 については、標準物質の保持時間との比較、分子イオンピークの値 ($m/z=493$) から Mv-3-glc であると予想される。グルコース配糖体よりもガラクトース配糖体の方が短い保持時間で溶出されることから判断すると、ピーク 8 の主成分はマルビジンのガラクトース配糖体 (Mv-3-gal) であることが示唆される。ピーク 10 の保持時間は 13.55 分、分子イオンピークの $m/z=463$ であった。この値の分子量を示すブルーベリーアントシアニンの候補として、ペオニジンの配糖体 (Peo-3-gal、Peo-3-glc)、マルビジンのアラビノース配糖体 (Mv-3-ara) が挙げられる。ペオニジン配糖体の溶出位置は、先述の通りにピーク 7~8 と考えられる。石井らの報告¹⁵⁾を参照すると、マルビジンの配糖体についてはガラクトース、グルコース、アラビノースの順番で溶出していた。ペオニジン配糖体である可能性が低く、溶出順から判断した結果、ピーク 10 は Mv-3-ara と推定した。

以上のように、ブルーベリー抽出物の LC-MS クロマトグラムを解析し、各ピークの推定アントシアニンに関する情報を得た (表 1)。この情報をもとにして冷風

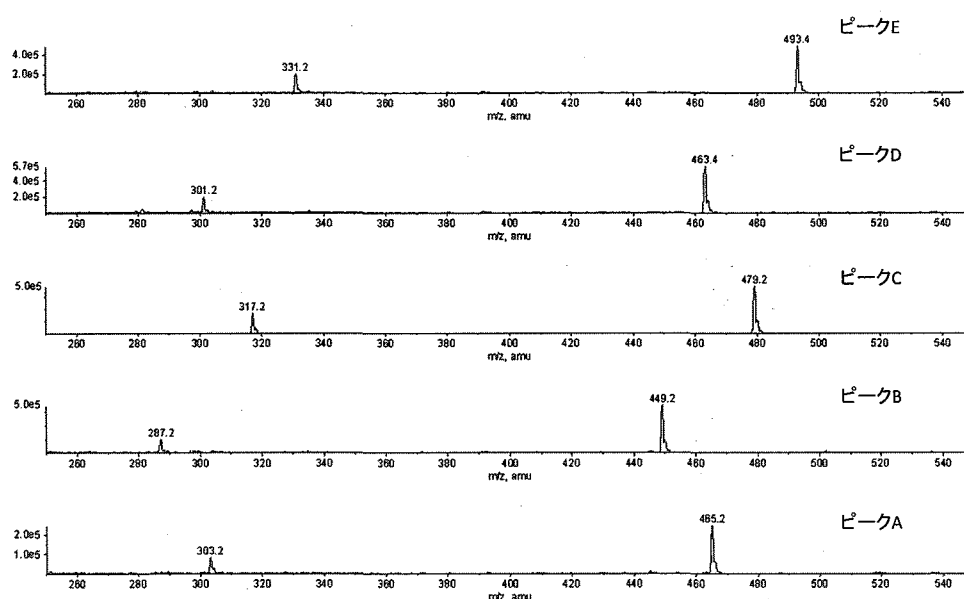


図 4 標準物質の MS スペクトル

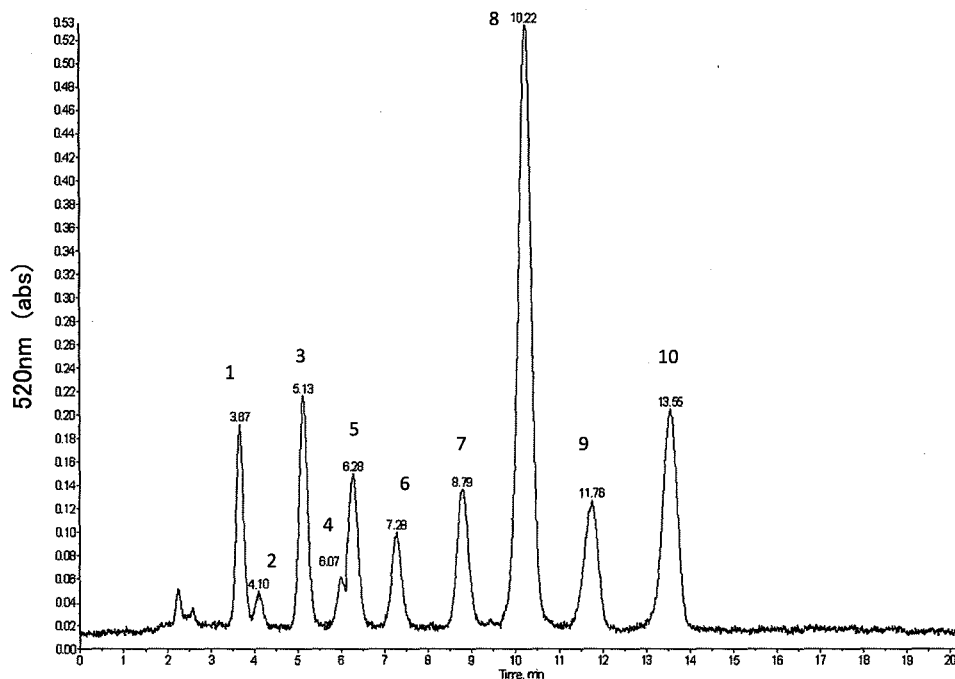


図5 ブルーベリー抽出物のクロマトグラム

乾燥ブルーベリーのアントシアニン含量を解析した(表2)。比較のために、乾燥前の試料抽出物についても同時に分析した。既知濃度の標準物質(各アントシアニンのグルコース配糖体)のピーク面積と、試料から得られたピーク面積との比を用いて、試料中のグルコース配糖体濃度を算出した。ガラクトースあるいはアラビノースの配糖体の濃度については、同じアグリコンをもつグルコース配糖体のピーク面積から算出した。ピーク8については分子イオンピークの面積割合に応じてピーク面積をMv-3-galとPeo-3-glcとに分配し、両成分濃度を決定した。

冷風乾燥前のブルーベリーは水分67.0%であった。このブルーベリーには湿重量1g当たり4.53mgのアントシアニンが含まれていた。11種類のアントシアニ

ンの中ではMv-3-galが最高値1.59mg/gを示し、組成比は35%であった。

冷風乾燥後、ブルーベリーの水分は35.0%に減少していた。この乾燥品に含まれているアントシアニン含量は8.11mg/gであり、乾燥前の値に比べて約1.8倍に増加していた。11成分の中ではMv-3-galが最も高い値(2.92mg/g)を示し、乾燥前とほぼ同じ組成比36.0%であった。

4. まとめ

冷風乾燥機を用いて乾燥されたラビットアイブルーベリー(*V. Ashei* Reade)に含まれているアントシアニンを解析した。試料からはデルフィニジン、シアニジン、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジンの各配

表1 ブルーベリーアントシアニンのLC-MS解析結果

ピーク番号	保持時間(分)	分子イオンピーク(m/z)	推定化合物
1	3.67	465	Dp-3-gal
2	4.10	465	Dp-3-glc
3	5.13	449	Cy-3-gal
4	6.07	449	Cy-3-glc
5	6.28	479	Pt-3-gal
6	7.28	479	Pt-3-glc
7	8.79	463	Peo-3-gal
8	10.22	493, 463	Mv-3-gal, Peo-3-glc
9	11.76	493	Mv-3-glc
10	13.55	463	Mv-3-ara

Dp:デルフィニジン、Cy:シアニジン、Pt:ペチュニジン、Peo:ペオニジン、Mv:マルビジン、glc:グルコース、gal:ガラクトース、ara:アラビノース

表2 冷風乾燥前後のブルーベリーアントシアニン含量

	水分 (%)	アントシアニン (mg/g)										合計	
		Dp-3-gal	Dp-3-glc	Cy-3-gal	Cy-3-glc	Pt-3-gal	Pt-3-glc	Peo-3-gal	Mv-3-gal	Peo-3-glc	Mv-3-glc		Mv-3-ara
冷風乾燥前	67.0	0.29	0.04	0.35	0.04	0.35	0.20	0.36	1.59	0.20	0.39	0.72	4.53
冷風乾燥後	35.0	0.92	0.03	0.71	0.07	0.73	0.21	0.65	2.92	0.37	0.33	1.16	8.11

Dp:デルフィニジン、Cy:シアニジン、Pt:ペチュニジン、Peo:ペオニジン、Mv:マルビジン、glc:グルコース、gal:ガラクトース、ara:アラビノース

糖体が11種類検出された。冷風乾燥後の試料は乾燥前に比べて約1.8倍高い値を示し、総アントシアニン量は1g当たり8.11mgであった。

アントシアニンは有用な成分である一方で、加工によって不安定になりやすい物質でもある。生鮮のブルーベリーに含まれているアントシアニンをできるだけ損なうことなく加工する方法が望まれる。こうした加工方法を検討する上で、アントシアニンを定性及び定量できる手段が必要となる。本研究のLC-MS装置を用いれば、複雑なブルーベリーアントシアニンの組成を解析し、その含量を算出することが可能である。LC-MSによるアントシアニン解析の精度を高めつつ、ブルーベリーの加工条件を今後検討する。

参考文献

- 1) http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/
- 2) 浜田和俊, 市川昌弘, 高知大学「中山間」プロジェクト講演集No. 2 大豊ブルーベリープロジェクト検討会, (2012)
- 3) 伴琢也ら, HPLCによるブルーベリー果実及びジャム中のアントシアニンの分析, 食品保蔵科学会誌, 29(3), (2003)153-157
- 4) P. Morazzoni et al., *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia*, 67, (1996)3-29
- 5) W. Zheng et al., Oxygen radical absorbing capacity of phenols in blueberry, cranberries, chokeberries and lingonberries, *J. Agric. Food Chem.*, 51(2), (2003)502-509
- 6) A. Scharrer et al., Anthocyanosides in the treatment of retinopathis, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 178(5), (1981)386-389
- 7) R. Boniface et al., Effect of anthocyanosides on human onnective tissue metabolism in the human, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 209(6), (1996)368-372
- 8) R. L. Galli et al., Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits, *Ann. NY Acad. Sci.*, 959, (2002)128-132
- 9) 浜渦康範ら, ブルーベリー果実の継続的摂取と自発運動によるラットの動脈硬化リスク軽減効果, 栄養誌, 58(5), (2005)259-266
- 10) 竹原良記, ブルーベリー抽出エキス及びアントシアニンによる内皮依存性血管弛緩と抗酸化能, 食品工業, 47(4), (2004)27-31
- 11) 平本恵一, ブルーベリーの疲労回復効果, 食品工業, 47(4), (2004)32-36
- 12) 大庭理一郎ら, アントシアニン～食品の色と健康～, 建帛社, (2000)57-102
- 13) G. Viguera et al., Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam, *J. Sci. Food Agric.*, 78, (1998)565-573
- 14) 寺原典彦ら, 紫甘しょに含まれる主要アントシアニンの一斉定量, 食科工, 54(1), (2007)33-38
- 15) 石川ら, ブルーベリーエキスを含有する健康食品中のアントシアニンの分析, 食衛誌, 49(5), (2008)339-346