

## 岐阜県産黒米からのアントシアニン系色素の抽出溶媒の検討

### An Examination of Optimal Extraction Solvents for Anthocyanin Pigments

#### from Black Rice Produced in Gifu

小野廣紀, 杉原菜穂, 廣瀬裕子, 片桐久美子

Kouki ONO, Naho SUGIHARA, Yuko HIROSE, and Kumiko KATAGIRI

#### Abstract

This paper describes the process for finding an optimum solvent for extracting anthocyanin pigments from black rice. Water, trifluoroacetic acid (TFA), formic acid, ethanol, and methanol containing hydrochloric acid (HCl) were tested as solvents for the extraction of anthocyanin pigments from black rice. Methanol containing HCl gave the highest value of total anthocyanin pigment contents compared to the other solvents. Therefore, methanol containing HCl proved to be the best solvent for the extraction of anthocyanin pigments from black rice. This solvent can be applied to the extraction of anthocyanin pigments from other food samples.

黒米は、中国では滋養強壮に効く「薬米」として漢方薬に重用されてきた長い歴史をもつ<sup>1)</sup>。元来、黒米にはビタミン、ミネラルのほか、ポリフェノールの一種であるアントシアニン系色素が豊富に含まれており、国内でも近年の健康食品ブームに乗って、黒米の成分特性を生かした商品開発が進んでいる<sup>1)</sup>。

岐阜県揖斐郡大野町では、数年前から町興しの一環として黒米を栽培し、さらに、黒米色素を利用した食品の開発を行い、現在では、そば、うどん、ラーメン、かまぼこ、飴、酒などを製品化し、大野町の特産品として販売している。

黒米中には実に豊富な栄養成分が含まれているが、どの成分がどのような生理効果をもつのかについては未だ特定できていないのが現状である<sup>2)</sup>。しかしながら、近年、ワインや茶など各種食品に含まれるポリフェノールが、活性酸素を消去する抗酸化活性を有することがわかり、食品中のポリフェノールは抗酸化性物質として注目されている<sup>3)4)</sup>。そこで、筆者らは岐阜県揖斐郡大野町で生産された黒米中のポリフェノールに着目し、これまでに黒米に含まれるポリフェノール成分の同定を行い、これが2種類のアントシアニン系色素から構成されていることを明らかにしている<sup>5)</sup>。

ところで、現在のところ食品に含まれるポリフェノール(アントシアニン)の抽出には、さまざまな溶媒が使用されており、決まった抽出溶媒はない。黒米中のアントシアニン系色素は、玄米の糠層(果皮部)に分布しているが、この色素は抽出溶媒の違いにより抽出効率が異なることがわかったので、ここに報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料および装置

本実験では、岐阜県揖斐郡大野町で2001年に生産された黒米を使用した。玄米の糠層をミルで粉砕し、その粉末をさらにふるいにかけて微粉末にした標品を試料とした。なお、シアニジン3-グルコシド(Cy 3-glc)はフナコシ(株)より購入した。その他の試薬はすべてナカライテスク製の特級品を用いた。また、測定には島津製作所製の分光光度計(UV-1600)を使用した。

##### 2. 抽出

抽出溶媒には蒸留水、1% (v/v) トリフルオロ酢酸(TFA)、5% (v/v) ギ酸、80% (v/v) エタノールおよび1% (v/v) 塩酸-メタノールを使用した。試料5gを三角フラスコに秤量し、各抽出溶媒50ml (w/v: 10倍)を加えて、振盪機を用いて150rpmで1時間(30℃)抽

出後、さらに4℃で一晩静置して抽出を行った。この抽出液を遠心分離(10,000×g, 10分間, 4℃)し、得られた上澄みを、さらに、ろ過(0.45 μm)して、ろ液を測定試料とした。

### 3. ポリフェノールの定量

抽出物中の総ポリフェノール量は上記の方法で抽出させた各試料を用いて、Folin-Denis法に従って定量した<sup>5)</sup>。水4mlが入った試験管に試料50□を加え、これに、フェノール試薬(Folin-Ciocalteuを水で5倍に希釈したもの)1mlを加えて攪拌した。さらに、この溶液に10%(w/v)炭酸ナトリウム溶液1mlを加え攪拌後、暗所で1時間反応させた後、760nmの吸光度を測定した。抽出物中の総ポリフェノール量は、(+)-カテキン相当量として求めた。なお、検量線については、(+)-カテキン1mgを抽出溶媒1mlに溶解し、この溶液を数段階希釈(6.25~50□/50□)後、同様に測定し、検量線を作製した。

### 4. アントシアニンの評価および定量

各試料を0.2Mグリシン-塩酸緩衝液(pH3.0)で32倍に希釈後、可視部スペクトル(400~700nm)および525nm(赤色度)と420nm(褐色度)の吸光度を測定し、525nm/420nmを色調の指標(色度)とした<sup>7)</sup>。また、抽出物中のアントシアニン量はアントシアニン特有の525nmにおける吸光度から評価した。抽出物中の総アントシアニン量は、1%塩酸-メタノール溶液中の530nmの吸光度を測定し、Cy 3-glc相当量として求めた。なお、検量線については、Cy 3-glc 1mgを1%塩酸-メタノール1mlに溶解し、この溶液を数段階希釈(10~50□/2ml)後、530nmにおける吸光度を測定し、検量線を作製した。

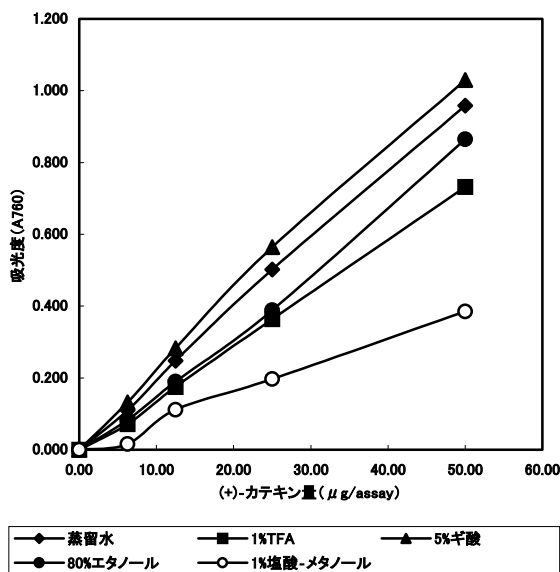


図1 (+)-カテキンを用いて抽出溶媒ごとに作製した検量線

## 実験結果および考察

### 1. ポリフェノールの抽出効率

(+)-カテキンを用いて作製した検量線は、使用したすべての溶媒においてほぼ直線性を示した(図1)。この検量線をもとに、各抽出物中の総ポリフェノール量を定量した。黒米のポリフェノールを5種類の溶媒:蒸留水, 1%TFA, 5%ギ酸, 80%エタノールおよび1%塩酸-メタノールで抽出し、各抽出物に含まれるポリフェノール量を比較検討した。

これら5種類の溶媒を比較した結果、抽出物中の総ポリフェノール量は、5%ギ酸<蒸留水<1%TFA<80%エタノールの順に高くなり、1%塩酸-メタノールで最も高い値を示した(図2)。

### 2. アントシアニンの抽出効率

各抽出物の可視部吸収スペクトルを測定した結果、蒸留水の抽出物では吸収ピークは検出されなかったが、その他の抽出物では、507nm(1%TFA), 508nm(5%ギ酸), 513.5nm(80%エタノール), 530nm(1%塩酸-メタノール)に吸収極大を示した。なお、「1%塩酸-メタノール」の抽出物の吸収ピークは、標準物質シアニジン3-グルコシドのものとは一致した。525nmにおける吸光度から各抽出物に含まれるアントシアニン量を比較すると、「1%塩酸-メタノール」で抽出した場合、「80%エタノール」の場合に比べて2倍以上高く、一方、「蒸留水」、「5%ギ酸」および「1%TFA」では「1%塩酸-メタノール」の10分の1以下と低い値であった(図3)。

シアニジン3-グルコシド(Cy 3-glc)を用いて作製した検量線は、直線性を示した(図4)。この検量線から、「1%塩酸-メタノール」の溶媒で抽出した場合の抽出物中の総アントシアニン量を定量した結果、米糠1gあたり5.55mg(Cy 3-glc相当量)含まれていた。

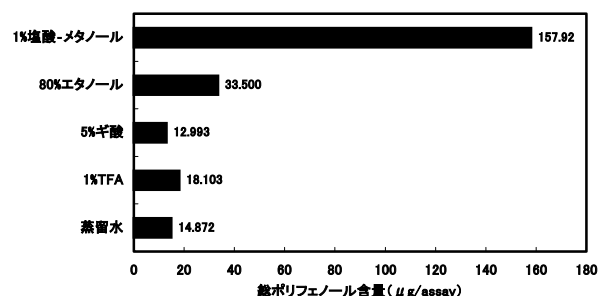


図2 抽出溶媒の違いによるポリフェノールの抽出効率の比較

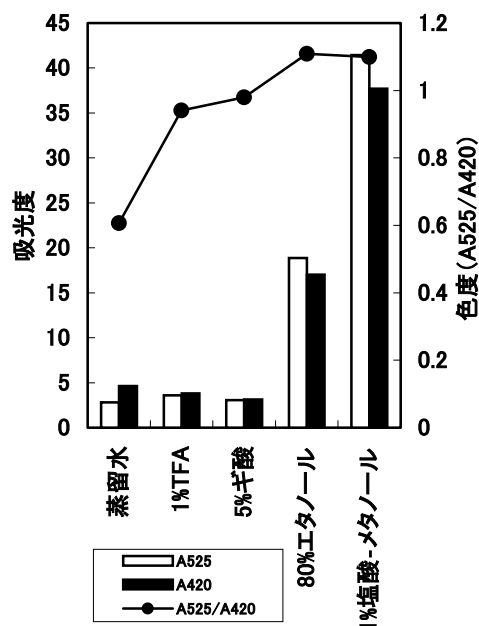


図3 抽出溶媒の違いによるアントシアニン系色素の抽出効率の比較

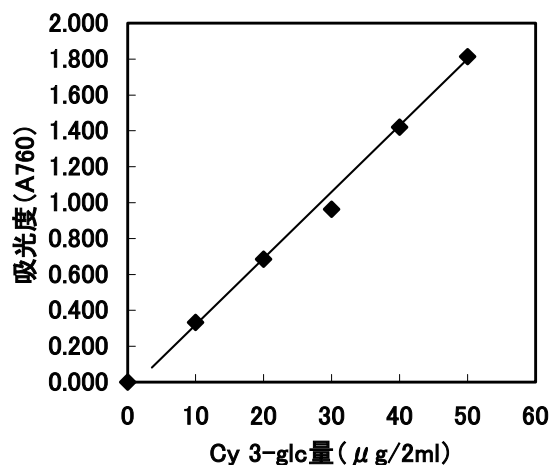


図4 シアニジン 3-グルコシド(Cy 3-glc)を用いて作製した検量線

### 3. 抽出物の色調

各抽出物の色調を図5に示した。「蒸留水」の場合、525nm (赤色度) より 420nm (褐色度) の吸光度の値の方が高く (図3), 色調は、らくだ色 (くすんだ黄赤) であった。「1%TFA」はスカーレット (あざやかな黄みの赤), 「5%ギ酸」はシグナルレッド (あざやかな赤色), 「80%エタノール」はボルドー (ごく暗い赤), 「1%塩酸-メタノール」ではミッドナイトブルー (ごく暗い紫みの青) の色合いを呈した<sup>8)</sup>。また, 黒米から造られた酒の色調は小豆色 (くすんだ黄みの赤) であった。

抽出物の色調と色度 (A525/A420) との関係は, 色度が高い値を示すほど赤色を増した。「1%塩酸-メタノール」の場合, 525nm (赤色度) および 420nm (褐色度) の吸光度は共に, 他の抽出物に比べて非常に高い値を示した (図3)。

抽出物の色調が濃くなるほど, ポリフェノール含量およびアントシアニン含量が増える傾向が見られた。しかし, 色度とポリフェノール含量およびアントシアニン含量との関係には相関は認められなかった。色度が一番高い値を示した「80%エタノール」が「1%塩酸-メタノール」よりもポリフェノール含量およびアントシアニン含量が低かったり, 「5%ギ酸」に比べて色度の低い「蒸留水」がポリフェノール含量では高い値を示したりした。これらの結果は, 各抽出溶媒によるポリフェノールおよびその中に占めるアントシアニンの抽出効率の違いが大きく影響していると考えられる。

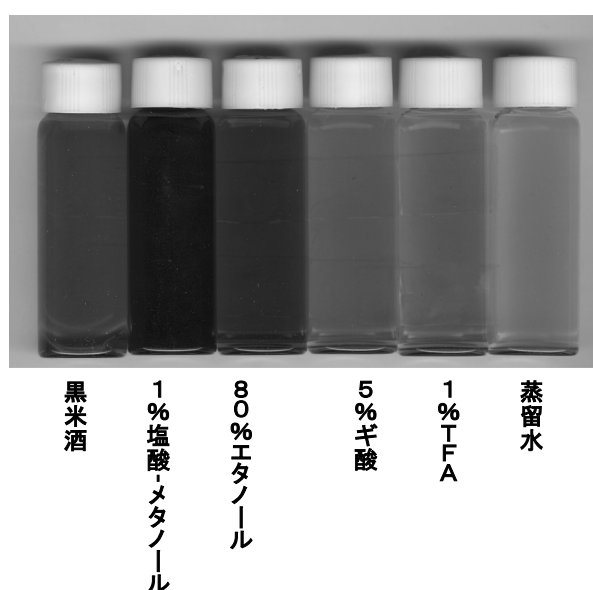


図5 各抽出物の色調

### 結 論

黒米からのアントシアニンの抽出溶媒としては、「1%塩酸 - メタノール」が最適であることがわかった。これまで研究者によって、異なる溶媒によって食品中からアントシアニン（ポリフェノール）は抽出されてきたが、抽出効率を考えた場合、適切な溶媒を用いることで、試料中に含まれるアントシアニン（ポリフェノール）量をより正確に求めることができるようになると思われる。

今後は黒米における抗酸化活性について検討するとともに、新たなる生理活性成分の検索や黒米の特性を生かした利用法などを検討する予定である。

### 参考文献

- 1) 猪谷富雄, 「赤米・紫黒米・香り米」, 農山漁村文化協会, pp.102-104, pp.132-134, 2000
- 2) 坪井誠, 黒米ポリフェノールの新規生理活性機能とその応用, FOOD Style 21, **6**, 53-58, 2002
- 3) 大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井亜紀夫 「アントシアニン」 建帛社, pp.124-150, 2000
- 4) 大澤俊彦, 色素・ポリフェノールと食品機能, 「長寿食のサイエンス」, 木村修一編, サイエンスフォーラム, pp.464-474, 2000
- 5) Ono, K., and Huang, S. A. Identification of Anthocyanins in Japanese Black Rice. *Gifu City Women's Research Bulletin*, **51**, 135-138, 2001
- 6) 鈴木誠, 渡辺敏郎, 三浦麻子, 原島恵美子, 中川靖枝, 辻啓介, Folin-Denis法による総ポリフェノール量測定のための抽出溶媒の検討, 日食工誌, **49**, 507-511, 2002
- 7) 猪谷富雄, 建本秀樹, 岡本実剛, 藤井一範, 武藤徳男, 有色米の抗酸化活性とポリフェノール成分の品種間差異, 日食工誌, **49**, 540-543, 2002
- 8) 大井義雄, 川崎秀昭, 「色彩 改訂版」, 日本色研事業株式会社, pp.70-75, 2002

(提出期日 2003年3月5日)