チョウマメ花アントシアニン色素の抗酸化活性に 関する研究

寺 原 典 彦 · 西 山 和 夫* (南九州大学園芸学部食品工学科,*宮崎大学農学部生物資源学科)

1. 目 的

近年、高齢化と健康志向が高まるなか、赤ワイン、緑茶、野菜、果実などを始めとする食品中のポリフェノール類が健康維持機能性成分として注目されている。ポリフェノール類の中でもフラボノイドとともにアントシアニン色素は植物性食品因子として日常的に摂取されることから、機能性色素として期待されるようになってきた。そのため視力改善作用"や、抗酸化性"、抗腫瘍性"、血清コレステロール低下作用"などの顕在的および潜在的機能性の発見と検索が相次いで行われ、また生体に摂取した場合の生体内動態、代謝産物などに関する研究も急速に進んでいる^{5,6}。

しかし、研究事例がいずれも比較的単純な配態体構造のアントシアニン色素に限られており、野菜・果実中に比較的多く含まれる、芳香族有機酸の結合したアシル化アントシアニン色素、特に芳香族有機酸を2個以上もつポリアシル化アントシアニン色素については、その安定性が高いため^{7,8)} 天然着色料として注目されているにもかかわらず食品機能性が検討された例は少ない。ポリアシル化アントシアニン色素においては、高安定性に加えて、結合芳香族有機酸が分子内でアグリコン部の各種機能性に及ぼす変化や新機能の付加作用などが予測される。そこで、我々は極めて高い安定性をもつチョウマメ花のポリアシル化アントシアニン色素に着目した。

チョウマメ (学名: Clitoria ternatea L., 和名: 蝶豆, 英語名: Butterfly pea) は東南アジ



一重タイプ花弁 八重タイプ花弁図1 チョウマメ (Clitoria tematea) 花弁

ア原産のマメ科 (Leguminosae) の植物で、熱帯地域で広く栽培されている。鮮やかな青紫色花を付けることから、観賞用に広く用いられている (図1)。また、その花弁から水抽出した青色色素は極めて安定なため (半減期はpH7,30°Cの水溶液中で67日)、東南アジア地方では伝統的に食品の着色料として使用されてきた。)。

我々はその高安定性の原因を探るために、まず 青色色素を単離し MS や NMR などによる構造 解析を行った。その結果、チョウマメ花弁中には デルフィニジン (Dp) の B-環の 3′,5′-水酸基に グルコース (G) と p-クマル酸 (C) が交互に結 合した 2 本の側鎖をもつポリアシル化アントシア ニン色素であるテルナチン (ternatin) 類が多数 含まれていることが明らかになった。そのうち、 主要テルナチン類 9 種 (T-A1, A2, A3, B1, B2, B3, B4, D1, D2) (図 2)、およびその他 のテルナチン類の 2 次元構造を全て明らかにする ことができた¹゚⁻¹゚゚。主要テルナチン類 9 種はい ずれも分子内にグルコース 4 ~ 7 個、p-クマル

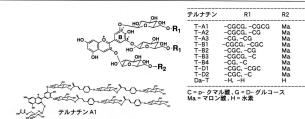


図2 テルナチン類

酸 2 ~ 4 個もち、分子量が1000~2000と大きい特 徴をもつ。特にテルナチン A1 は分子量が2108と、 現在までに見いだされているアントシアニンの中 では最大である。

さらに、テルナチン類を含めた各種アシル化アントシアニンの構造と水溶液中での安定性との相関の研究を行い、アントシアニン中の芳香族アシル基が安定性を強化する事、およびアシル化アントシアニンの中ではテルナチン類が最も安定であることなどを確認した1%。これは、水溶液中で図3(a)のように伸張型ではなく図3(b)のように分子内会合型コンフォメーションを取っており、(1) 3、5、側鎖中のp-クマル酸とアグリコン(Dp)部の高効率的な分子内スタッキングが退色につながる2位炭素での水和反応を防ぎ、大きな安定化効果をもたらすこと10-210。従って、(2)p-

クマル酸数が多いほど (T-A1,B1,D1 など) 安定であること、などが判明した 22 。

一方、予備的な検討でテルナチン類に抗酸化性が見いだされた。これは、緑色植物は光合成により酸素を発生するため、動物細胞に比べて細胞内酸素濃度が高い環境下に置かれていること。また、チョウマメなどの(亜)熱帯産植物は常時、紫外線(UV-A,B)の強い日光を浴びており、光酸化ストレスに強く曝されていることが考えられる。このような理由から植物は、アントシアニンなどのポリフェノール類をUVカットおよび光酸化ストレス防御(抗酸化)作用物質としてもっていてもおかしくないことが考えられた²³。さらには、テルナチン分子内のp-クマル酸が分子内シネルギストとしてテルナチン分子で高安定化のみならず、抗酸化性などの機能性をも付与あるいは増強

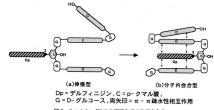


図3 テルナチン B2 の水溶液中での分子内会合

するのではないかと考えるに至った。

この様な観点から、チョウマメ花粗抽出色素 (Ct 粗) および単離テルナチン類を各種の抗酸化 活性評価系にかけ、抗酸化活性発現機構を検討し、 さらにその知見を基に高品位な機能性食用色素や 新規な疾病予防食品素材としての有効利用への可 能性を考察した。

2. 方 法

2.1 実験材料

チョウマメの種子を $3 \sim 4$ 月に南九州大学の農場に挽種し、成熟花を 7 月 ~ 10 月まで採取した。これを45°C、1夜、送風乾燥器で乾燥してシリカゲルデシケータ中に入れ、使用するまで冷蔵した。

2.2 チョウマメ花より粗抽出色素の調製および主要テルナチン類の単離

(1) 分析用 HPLC

HPLC 装置:日立 L-6200 インテルジェントポ ンプシステム

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 $\phi \times 250$ mm, 5 μm, GL サイエンス)

カラム温度:35°C

流速:10ml/min

溶媒系:

A:リン酸-水 (1.5:98.5 v/v)

B;リン酸-酢酸-アセトニトリル-水 (1.5:

20:25:53.5 v/v

リニアーグラジエント; B 25% in A to B 85% in A for 40 min.

檢出波長: 530, 310 nm

(2) 分取用 HPLC

HPLC装置:日本分光リサイクル分取 HPLC システム (助成購入分)

カラム:Inertsil ODS ($20\phi \times 250 \text{ mm}$, $5\mu\text{m}$ GL サイエンス)

流速:7.0 ml/min

溶媒系:

A;酢酸-水 (15:85 v/v)

B;酢酸-アセトニトリル-水 (15:30:55 v/v)

イソクラテック;A:B=95:5~60:40

検出波長:530,310 nm

(3) テルナチン類の単離

図4(a)の様に、チョウマメの乾燥花弁を15% 酢酸で抽出した。粗抽出液は HPLC 分析で図4 (b) の様な色素組成であった。この粗抽出液を XAD-2000カラムクロマトグラフィーにかけ色素 を吸着させ、水洗後、1%酢酸-70%エタノール で溶出した。濃縮・乾固後メタノールとエーテル より粗色素(Ct 粗)を得た。乾燥花弁からの収 量は0.4%であった。さらに、粗色素を0.1%ト リフルオロ酢酸(TFA)-エタノールを溶出溶媒 として PVP カラムクロマトグラフィーにかけ色

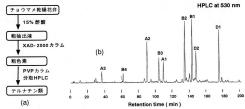


図4 チョウマメ花色素の抽出法(a)と粗抽出液の色素組成(b)

素を4フラクションに荒分けした。各フラクションに含まれるテルナチン類を、リサイクル分取 HPLCシステムを用いて単離した。単離したテルナチン類はいずれも TFA に溶解し、エーテル を過剰量加えて沈殿後、遠心分離・乾燥した。主 要テルナチン類 9 種(T-A1, A2, A3, B1, B2, B3, B4, D1, D2) の赤紫色の TFA 塩が粉末状に得られた。

(4) デアシルテルナチンの調製

Ct 粗を 2N NaOH によりアルカリ加水分解し 完全に脱アシル化した。反応液をテルナチン単離 と同様に、XAD-2000, PVP カラムおよび分取 HPLC 分離を行い、デアシルテルナチン(Da-T、 デルフィニジン 3, 3′, 5′-トリグルコシド、図 2, 図 12) の赤色粉末の TFA 塩を得た¹²¹。

2.3 DPPHラジカルの消去活性試験 (DPPH-HPLC法)

Ct 粗および単離したテルナチン類について DPPH ラジカルの消去活性を試験した。DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) はそれ自体 が紫色のラジカルで、図5の様に抗酸化性物質か ら水素を引き抜き、自身は還元されて紫色が退色 する。この退色率を測定して抗酸化性物質の水素 供与能(ラジカル消去能)を評価する事ができる。

DPPH ラジカル消去活性の測定には Yamaguchi らの方法**(に準じて行ったが、この方法は HPLC を用いて分離・定量するため着色物質の 妨害を受けない特徴を有する。

【実験操作】

活性測定は1mM 試料-エタノール溶液(Ct 粗

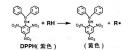


図5 DPPH ラジカルの水素引き抜き反応

は 1 mg/m I の濃度で行った。) $25 \mu I$ に、エタノール $75 \mu I$ 、トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) $400 \mu I$ 、および $500 \mu M$ DPPH-エタノール溶液 $500 \mu I$ を加えてよく攪拌し、室温・暗所に20分放置した。この反応溶液の $15 \mu I$ を HPLC で分析した。コントロールは試料溶液の代わりにエタノールのみ $25 \mu I$ を加えて測定した。

試料およびコントロールの残存 DPPH のピー ク面積(それぞれ、As および Ac)より、(1)式 を用いて DPPH ラジカル消去能 RS(%)を計算 した。

RS(%)=100×(100-As)/Ac(1) また、HPLC 分析条件は以下のようであった。 HPLC 装置:日立 L-6200インテルジェントポ ンプシステム

カラム:Wakosil-II3C18AR (4.6 ϕ ×75 mm) カラム温度:室温

流速:1.0 ml/min

検出波長:517~520 nm

溶媒系:蒸留水:アセトニトリル=53:47~

50:50 (v/v), イソクラテック

注入量:15 ul

2.4 脂質過酸化の抑制活性試験 (カロチン退 色法)

Ct 粗および単離したテルナチン類の脂質過酸 化に対する抑制活性は Igarashi らのカロチン退 色法^{35,26)}に準じて行った。その測定原理は、図 6 に示すようにリポキシゲナーゼが酸素をリノール 酸に付加し過酸化物 (ヒドロベルオキシド)を生 じ、ヒドロベルオキシドあるいはその分解物によ

リノール酸
$$\xrightarrow{0_1+\nu_0/2-\nu_0}$$
 リノール酸-OOH $\stackrel{O_2}{}$ β -カロチン $\xrightarrow{}$ 無色

図 6 β-カロチンの退色反応

 O_2 + ASA \longrightarrow H_2O_2 + DHA

Fe(II) + H₂O₂ —— Fe(III) + OH + OH (Fenton反成)

*OH + デオキシリボース — → 酸化分解物

図7 AsA-Fe (III) 系でのデオキシリボースの酸化分解反応

り β -カロチンが酸化を受け退色する。もし、抗酸化物質が共存すれば β -カロチンより先に反応して、 β -カロチンの退色が押さえられる。従って、 β -カロチンの退色率を測定することで、共存物質の抗酸化性が評価できる。

【実験操作】

脂質過酸化の抑制活性は $1 \, \mathrm{mM}$ 試料- $x \, \mathrm{y} \, \mathrm{j}$ ル溶液($Ct \, \mathrm{Hd} \, t \, 1 \, \mathrm{mg} \, \mathrm{lm} \, l$ の濃度で行った。)200 $\mu l \, \mathrm{tc}$ 、 $50 \, \mathrm{mg} \, \mathrm{lm} \, l$ リノール酸- $x \, \mathrm{s} \, \mathrm{j} \, \mathrm{s} \, \mathrm{tg}$ 50 μl 、 $80 \, \mathrm{lm} \, l$ McIlvaine 緩衝液($\mathrm{pH} \, 7.0 \, \mathrm{j} \, 3.95 \, \mathrm{ml}$, $\mathrm{ts} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{tg} \, \mathrm{j} \, \mathrm{tg}$ が $\mathrm{lm} \, \mathrm{lm} \, \mathrm{j} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{tg} \, \mathrm{j}$ $\mathrm{lm} \, \mathrm{lm} \, \mathrm{j} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{tg} \, \mathrm{j} \, \mathrm{tg} \, \mathrm{lm} \, \mathrm{j} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{tg} \, \mathrm{j}$ $\mathrm{lm} \, \mathrm{lm} \, \mathrm{lm} \, \mathrm{j} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{tg} \, \mathrm{j} \, \mathrm{tg} \, \mathrm{lm} \, \mathrm{lm} \, \mathrm{j} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{ts} \, \mathrm{tg} \, \mathrm{lm} \,$

$Rs \% = 100 \times A_{10}/A_{0}$

次に、各試料共存下での β -カロチン退色阻止 率(Inhibitory ratio:IR%)を(2)式より算出し た。

IR %= $100 \times (Rs-Rc)/(100-Rc)$ …(2) ただし、コントロールは試料溶液の代わりに、 エタノールのみを $200 \mu l$ 加え、直ちに 460 nm で 吸光度を測定した(0 時間での吸光度: A_o)。次 に、 20° Cの恒温器に入れ10分間反応後、再度 460nm で吸光度を測定した(A_{10})。これより、コン トロールでの β -カロチン残存率(Rc %)を算出 した。 Rc %=100×A₁₀/A₀

2.5 アスコルビン酸-三価鉄系によるデオキシ リボースの酸化分解抑制活性試験

Ct粗および単離したテルナチン類について、 アスコルビン酸-三価鉄(AsA-Fe(III))系で生 じるヒドロキシルラジカルによるデオキシリボー スの酸化分解抑制活性を検討した。AsA-Fe (III)系によるデオキシリボースの酸化分解は図 7の様な反応機構で進む²⁷⁾。

すなわち酸素の存在下、アスコルビン酸の酸化にともなって生成した過酸化水素とアスコルビン酸で還元されて生成した過酸化水素とアスコルビン酸で還元されて生成した二価鉄による Fenton 反応でヒドロキシルラジカル (・OH) が生成する。この・OH は非常に反応性が高く、標的分子であるデオキシリボースを酸化的に分解する²⁷⁾。この系にチオバルビツール酸 (TBA) を加えて酸性条件下で加熱すると TBA 反応生成物質 (TBARS) が生成するので、生じた TBARS を蛍光光度計で定量することで抗酸化活性が評価できる²⁸⁾。

【実験操作】

試験溶液は5 mM 2-デオキシリボース 0.8 ml, 250 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.8 ml, 0.25 mM 塩化第二鉄 0.8 ml, および 0.5 mM アスコルビン酸 0.8 ml を混合し、これに試料水溶液 (Ct粗は μg/ml の濃度単位で作成した) 0.8 ml 加えて調製した。この混合液を 2 時間, 3 TCで反応させた後、1 % TBA-0.05 M NaOH 溶液および 2.8 %トリクロロ酢酸を 1 ml ずつ加え、沸騰水浴中で10分間加熱した。氷冷後、4 ml の

n-ブタノールを加え、1 分間激しく振って、遠 心分離後、ブタノール層を蛍光光度計(励起波長 532 nm、蛍光波長 553nm)で測定した。テルナ チン自体の色がデオキシリボース法に影響を与え ることがわかったので、テルナチンによる蛍光発 生の阻害率を測定し、差し引いて補正した。デオ キシリボースの酸化分解抑制率 D (%) は(3)式で 計算した。

- D (%) = $100 \times (A B/A)$ (3)
- A:テルナチン無添加の場合の蛍光強度
- B: テルナチンを加えた場合の蛍光強度
- 2.6 AsA-Fe (III) 系によるヒアルロン酸の酸 化分解抑制活性試験

AsA-Fe (III) 系により生成するヒドロキシル ラジカルが高分子であるヒアルロン酸を酸化分解 すると溶液の粘度が低下する²⁰⁾。従って、ヒアル ロン酸の粘度を測定することにより抗酸化活性を 評価できる。この方法は溶液の粘度を測定するた め着色物質などの影響を受けない特徴を有する。 【実験操作】

ヒアルロン酸ナトリウム (鶏冠製), アスコル ビン酸 (ナトリウム塩), リン酸緩衝液および過 酸化水素を下記の最終濃度になるように混合した。 反応混合溶液量は5m/とした。

反応液組成

最終濃度 ヒアルロン酸 2.5 mg/m*l*

リン酸緩衝液 (pH 7.4) 50 mM 塩化第二鉄 0.01 mM テルナチン 0.1 mM アスコルビン酸 0.1 mM

混合液を37°Cで30分間インキュベートし、キャ ノンフェンスケ粘度計(毛細管型粘度計)で流下 時間を測定した。比較標準物質として緑茶カテキン類を用いた。テルナチン類とカテキンの最終濃 度は100 μM とした。

テルナチンによるヒアルロン酸の酸化分解抑制 $\approx D(\%)$ は(4)式により計算した。

- $D (\%) = 100 \times (C B) / (A B) \cdot \cdots \cdot (4)$
- A:未処理のヒアルロン酸(ヒアルロン酸と 緩衝液)の流下時間
- B:アスコルビン酸/過酸化水素で処理した ヒアルロン酸の流下時間
- C:Bに試料を添加した時の流下時間

3. 結 果

3.1 DPPH ラジカルの消去活性および脂質過 酸化の抑制活性

テルナチン類の DPPH ラジカル消去活性は図

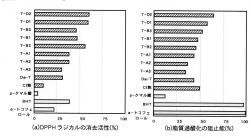


図8 テルナチン類の DPPH ラジカルの消去活性(a)および脂質過酸化の抑制活性(b)

8(a)の様に、また、脂質過酸化の抑制活性は図 8 (b)の様になった。テルナチン類は両試験法とも遊離の p-クマル酸より高い活性を示した。また、合成抗酸化剤の BHT や天然抗酸化剤の $\alpha-$ トコフェロールに比較して、テルナチン類の DPPH ラジカルの消去活性は高く、一方、脂質過酸化阻止能は低いことが判明した。

テルナチン類同士についてはいずれの試験法と もルナチン D (T-D) 類>T-B 類>T-A 類≥ Da-T の順であった。すなわち,テルナチン類は 相当する脱アシル体(Da-T)より高い活性を示 した。

3.2 AsA-Fe (III) 系発生ヒドロキシラジカル による生体成分の酸化分解抑制活性

(1) デオキシリボースおよびヒアルロン酸の

酸化分解抑制活性

AsA-Fe (III) 系で生成するヒドロキシラジカルによるデオキシリボースおよびヒアルロン酸の酸化分解に対するテルナチン類の抑制活性の検討結果は表1の様になった。デオキシリボース分解抑制活性をみると、テルナチンA2とB4ともに没食子酸(ガレート)を分子内にエステル結合でもっているエピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート(図9)に比べると抑制活性は低いが、他のカテキン類とほぼ同じ程度の抑制作用を示すことが明らかとなった。また、ヒアルロン酸を用いた系においても平行性のある結果が得られた。さらに、デオキシリボース分解抑制活性において、テルナチンB4の(T-B類)ほうがA2(T-A類)より高活性であることがわかり、他の評価法との結果とも一致した。

表1 テルナチン類およびカテキン類のデオキシリボースおよび トアルロン酸酸化分解抑制活性

	酸化分解阻止率 (%)	
_	デオキシリボース	ヒアルロン酸
テルナチン A2	20.7	56.6
テルナチン B4	38.9	NT
(+)-カテキン	8.4	39.8
エピカテキン	19.3	30.3
エピガロカテキン	28.6	24.2
エピカテキンガレート	89.9	70.0
エピガロカテキンガレート	94.7	89.2

NT:試験せず

図9 緑茶カテキン類

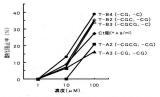


図 10 As-Fe 系によるデオキシリボースの酸化分解に対する 阻止率

(2) デオキシリボースの分解に対するテルナチンの濃度の影響

図10 に示したように AsA-Fe(III)系で生成するヒドロキシラジカルによるデオキシリボースの分解に対するテルナチン類の抑制作用は濃度に依存的であり、作用本体がテルナチン類であることが確認された。今回調べた条件では濃度1μM以上から抑制作用が認められた。また、テルナチン B類(T-B2, B3, B4)の方がテルナチン A類(T-A2, A3)よりも高い抑制作用を示した。

4. 考察

4.1 テルナチン類の抗酸性

テルナチン類の抗酸化性はいずれの評価方法に おいても、T-D類>T-B類>T-A 類≥Da-T の 順であった。これは溶液中での分子内会合が大き

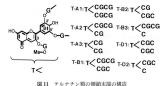


図11 ブルナナン頬の側與木埔の梅垣

な要因になっているように考えられた。

- (1) 3′,5′-側鎖の内側のp-クマル酸は図3のような分子内会合のため側鎖中に埋もれているため,側鎖末端に位置する(分子内会合の外側に露出しており,遊離のフェノール性水酸基を有する)p-クマル酸数が多い順(T-D類は2個>T-B類は1個>T-A類は0個,図11)に活性が高いものと説明できる。というのは,p-クマル酸やDa-Tなどのポリフェノールの抗酸化性の強さは生じたフェノキシラジカルを共鳴安定化する構造であるほど大きいと考えられるためである(図12)。
- (2) また、T-A 類は p-クマル酸をもつにもかかわらず、抗酸化性が Da-T と同程度である。これは、基本骨格そのもの (Da-T の部分) はある程度の抗酸化性をもっているが、p-クマル酸は分子内会合のため側鎖中に埋もれており抗酸化性が発揮できないものと説明できた。実際、テル

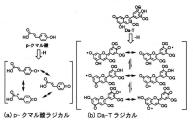


図 12 p-クマル酸および Da-Tラジカルの共鳴安定化

ナチン類は溶液中でアグリコン部と側鎖部の p-クマル酸がサンドイッチ型スタッキングにより、 強く分子内会合を起こしていることが NMR 測 定で確認されている¹⁹。

(3) T-D類>T-B類>T-A類の順序は疎水性の高い順序でもある。カロチン退色法において生ずる疎水性の高いリノール酸の過酸化物などは T-D類>T-B類>T-A類の順序に親和性が高く,反応しやすいのではないかと考えられた。実際,この系では DPPH 系に比較して疎水性の高い BHT や α -トコフェロールが極めて高い活性をもつ結果となっている。

4.2 テルナチン類の抗酸化発現機構

今回の検討でチョウマメ花粗色素やテルナチン 類の平均的抗酸化性は数種の評価法で検討した結果、DPPH ラジカルやヒドロキシラジカルを消去でき、また過酸化脂質あるいはその分解物と反応・消去できることより、ラジカルの連鎖開始および成長反応を断つラジカル補足型抗酸化物と考えることができた。

また、評価法ごとに抗酸化機構について考察してみると、カロチン退色系では酵素リポキシゲナーゼを含むため、テルナチン類の純粋な脂質過酸化阻止反応の他に、酵素の阻害作用による見かけ上の活性が高くなっている可能性も考えられる。酵素阻害機構の一可能性として、リポキシゲナーゼの活性中心の Fe (III) をキレーティングにより、封鎖することが考えられる。

また、AsA-Fe (III)系についても、結果として現れてくる抗酸化性はテルナチン類が(1)生成ヒドロキシラジカルを消去する³¹⁾、他に、(2) Fe (III) をキレーティング封鎖することによりヒドロキシラジカル生成を阻害すること²²⁾なども考えられる。詳しい抗酸化機構は更なる検討が必要である。

5. ま と め

1. テルナチン類はラジカル補足型抗酸化物と 考えることができた。それ以外に酵素阻害か金属 封鎖による間接的な抗酸化活性をもっている可能 性も否定できない。

2. テルナチン類は分子内のp-クマル酸がアグリコンと分子内会合をおこし,アグリコン部の 色調の安定化を大きく増強している。一方,この分子内会合のために抗酸化性はp-クマル酸数や分子量に無関係で側鎖末端に位置するp-クマル酸数のみに関係してくる。従って末端p-クマル酸数が多いT-D類の活性が最も高い。しかし,テルナチン全体としての平均的な抗酸化活性はそれほど高くない。

これらの事実より,色素分子の安定性と抗酸化 性に対する結合有機酸の寄与はやや異なり,安定 性と抗酸化性が必ずしも比例するわけではないこ とがわかる。また,これらの知見は他のアシル化 アントシアニン類にも適応できるものと考えられ る。

3. チョウマメ花の粗抽出物は(1)青紫色のアントシアニン系色素であるテルナチン類(ボリーp-クマリル化デルフィニジン3,3、5、トリグルコシド)を含み、高い色調安定性をもつこと、(2)伝統的に食品の着色料として実際に使用され続けていることから、安全性での問題は少ないものと考えられること、(3)実用化された青色系天然色素の数が少ないこと、(4)テルナチンBとD類が主要色素として含まれ適度な抗酸化活性をもつことなどより、新規な多機能性天然色素として、食用色素、化粧品および疾病予防食品素材などの応用が期待される。

6. 今後の課題

チョウマメ花の色素テルナチン類については,

(1)混合 (複合) 系での抗酸化性の共同効果の有無 の検討, (2) in vivo での機能性評価, (3)消化管に よる吸収を含めた体内動態の研究, (4)細胞・組織 培養による大量生産の確立などの課題が残されて いる。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究助成 を賜りました浦上食品・食文化振興財団および関 係各位に心から感謝いたしますと共に貴財団の 益々のご発展をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) 津志田藤二郎:食品工業, 8, 34-39 (1997)
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S. W., Kawakishi, S. and Osawa, T.: J. Agric. Food Chem., 42, 2407-2410 (1994)
- Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., Hasegawa, M. and Terabe, K.: Cancer Biother. Radiopharm., 12, 277-280 (1997)
- Igarashi K, Abe S, Satoh J: Agric. Biol. Chem., 54, 171-175 (1990)
- 5) 仲川清隆,工藤幸,宫澤陽夫:日本農芸化学会東北支部会(1998)
- 6) 津田孝範, 堀尾文彦, 大澤俊彦:日本農芸化学会1999 年度大会要旨集 p.130 (1999)
- 7) 寺原典彦, 紺谷靖英, 浜本浩二, 筬島豊, 斎藤規夫: 南九州大学研究報告, No.22, 203-209 (1992)
- Saito, N., Abe, K., Honda, T., Timberlake, C. F., Bridle, P.: Phytochemistry, 24, 1583-1586 (1985)
- Lowry, J. B., Chew, L.: Econ. Bot., 28, 61-62 (1974)
- Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and Osajima, Y.: *Tetrahedron Lett*, **30**, 5305-5308 (1989)
 Kondo, T., Ueda, M. and Goto, T.: *Tetrahedron*
- 46, 4749-4756 (1990) 12) Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and
- Osajima, Y.: *Phytochemistry*, **29**, 949–953 (1990)

 13) Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and Osajima, Y.: *Tetrahedron Lett*, **31**, 2921–2924 (1990)
- 14) Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and

- Osajima, Y.: Heterocycles, 31, 1773-1776 (1990)
- Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and Osajima, Y.: Phytochemistry, 29, 3686-3687 (1990)
- Terahara, N., Oda, M., Matsui, T., Osajima, Y.,
 Saito, N., Toki, K. and Honda, T.: J. Nat. Prod., 59,
 139-144 (1996)
- Terahara, N., Toki, K., Saito, N., Honda, T., Matsui, T. and Osajima, Y.: J. Nat. Prod., 61, 1361-1367 (1998)
- 18) 寺原典彦:南九州大学研究報告, No.23, 1-132 (1993)
- 19) 依田恵子,春山英幸,桑野晴光,斎藤規夫:第28回N MR討論会,要旨集 p.191-194 (1989)
- Terahara, N.: The Third International Congress & Symposium on Natural Colorants III, Princeton, New Jersey, USA, p.351-360 (1998)
- Goto, T.: Forschritte Chem Org Naturstoffe, 30, 114-158 (1987)
- Goto, T. and Kondo, T.: Angew Chem Int Ed Engl,
 30, 17-33 (1991)
- 23) 大澤俊彦:臨床栄養, 89, 567-570 (1996)
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, J.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 62, 1201-1204 (1998)
- Igarashi, K., Takanashi, K., Makino, M., Yasui, T.: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 36, 852-856 (1989)
- Igarashi, K., Yoshida, T. and Suzuki, E.: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 40, 138-143 (1993)
- Gutteridge, J. M. C.: Biochem. J. 243, 709-714 (1987)
- Gutteridge, J. M. C.: FEBS Lett. 128, 343-346 (1981)
- Fink, R. T. and Lengfelder, E.: Free Rad. Res. Comms. 3, 85-92 (1987)
- 30) 二木鋭雄,島崎弘幸,美濃真:抗酸化性物質-フリーラジカルと生体防衛-,学会出版センター,p.5-11 (1994)
- Castelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., Bolwell,
 G. P., Pridham, J., Sampson, J., Rice-Evans, C.: FEBS Lett. 368, 188-192 (1995)
- Donnelly, J. K. and Robinson, D. S.: Free Rad. Res., 22, 147-176 (1995)

Antioxidative activity of anthocyanins from butterfly pea flowers

Norihiko Terahara and Kazuo Nishiyama*

(Department of Food Science and Technology, College of Horticulture, Minami-Kyushu University, and Department of Biological Resource Sciences Miyazaki University*)

- Ternatins are considered as radical-scavenging type antioxidants, but indirect antioxidative mechanism by metal (Fe (III))-chelating is also possible.
- 2. Ternatins orients a highly efficient sandwich-type intramolecular stacking association between aglycon and p-coumaric acids in 3', 5'-side chains to protect the chromophores from hydration leading to decoloration. Otherwise, the antioxidative activity responsible to only terminal p-coumaric residues not numbers of p-coumaric residues in 3', 5'-side chains and molecular weights due to the intramolecular association. The order of antioxidative activity is T-Ds>T-Bs>T-As, since the more ternatin has terminal p-coumaric residues, the stronger its activity is.
- The intramolecular contributions of acyl residues to stability and antioxidative activity of ternatins are not paralleled. This tendency is considered to be same as other polyacylated anthocyanins.
- 4. Crude pigment extract from blue flowers of butterfly pea, Clitoria ternatea L., which contains ternatins (delphinidin 3-malonylGs connected with a series of 3', 5' -GC... side chains (G: D-glucose, C: p-coumaric acid)), is expected as new multifunctional natural pigment for a food colorant, cosmetic, and disease-preventing food material. The reasons are as follows: (1) Ternatins have high stable color in aqueous solution; (2) The crude pigment is potentially safe due to traditional use for food colors in Southeast Asia; (3) Blue type natural pigments are rarely used for food color; (4) The crude pigment has moderate antioxidative activity since it mainly contains ternatin B and D groups with relatively high antioxidative activity.