

青森県の特産品に含まれるアントシアニンを 用いて紫外線を遮断するには



青森県立五所川原高等学校 理数科 化学1班

市川心陽 坂本藍香 福地夏帆 奈良岡桜 長谷川瑞葵

担当教諭 三上知夏

1. 目的・研究動機, 語句の説明

市販の日焼け止めに含まれる紫外線吸収剤, 紫外線散乱剤は肌や環境に悪影響であることを知った。青森県の特産品であるリンゴやカシスにはアントシアニンというポリフェノール(※1)が多く含まれていることを知り, その紫外線吸収作用で, 市販の日焼け止めより肌や環境に優しい日焼け止めを作り, 紫外線から人の肌を守ることはできないか, アントシアニン(※2)で紫外線を遮断することはできないかと考え, 今回の研究テーマを定めた。

※1 植物が紫外線や外敵から身を守るために生成する苦みや色素の成分の総称。

※2 ブルーベリー, リンゴ, カシスなどの花や果実に含まれるポリフェノールの一種で, 紫外線吸収作用や抗酸化作用を持つ。植物が紫外線などの有害な光から身(実)を守るために蓄えられる天然色素。酸性では赤色を示し, 最も安定している。塩基性では青紫色を示す。

2. 仮説

リンゴやカシスをすりおろしたのからエバポレーターを用いてポリフェノールを抽出し, アントシアニンの有無を確認してから, それを紫外線散乱材などが含まれていない日焼け止めに混ぜることで紫外線吸収作用のほかに抗酸化作用を持った日焼け止めの作成ができるのではないかと考えた。また, リンゴとカシスでは実の色の濃さからカシスの方がポリフェノールをより効率的に抽出できるのではないかと考えた。

3. 事前準備

1. リンゴ(青森県産サンふじ)からの抽出(皮のみ)

1-1 ポリフェノールを抽出するために, すりおろしたリンゴの皮を 70%エタノール水溶液中(70%が最も細胞を破壊しやすい濃度)に浸し, 冷蔵庫で 24 時間冷蔵庫静置する。

1-2 24 時間の静置の後, ガーゼで濾してろ過し, ろ液を取り出す。

1-3 取り出した溶液を 30°C(※3)のエバポレーターで濃縮する。

1-4 濃縮した溶液を酸性で保管するためにクエン酸溶液 ($6.7 \times 10^{-4} \text{mol/L}$) (※4)を加える。
これをリンゴ抽出液とする。

2. カシス(青森県産あおもりカシス)からの抽出(皮つきの実ごと)

2-1 ポリフェノールを抽出するために, ミキサーで粉碎した冷凍カシスを 70%エタノール水溶液中に浸し, 冷蔵庫で 24 時間静置する。

2-2 24 時間の静置の後, ガーゼで濾してろ過し, ろ液を取り出す。

2-3 取り出した溶液を 30°C(※3)のエバポレーターで濃縮する。

2-4 濃縮した溶液を酸性で保管するためにクエン酸溶液 ($6.7 \times 10^{-4} \text{mol/L}$) (※4)を加える。
これをカシス抽出液とする。

※3 ポリフェノールは, 30°Cより高温の状態では, アントシアニン色素が発現しにくくなることから, 湯浴の温度を 30°Cに保つことで, 抽出効率に及ぼす影響を最小限にした。

※4 ポリフェノールは, 酸性溶液中で安定な状態となることから, pH5.0 の水溶液で保存するのが有効であると考えたため。

4. 実験

1. TLC 法によるアントシアニンの確認

TLC 法とは薄層クロマトグラフィー (Thin Layered Chromatography) のことで, ガラス, アルミニウム等の板上にシリカゲル, アルミナやセルロース等の吸着剤を薄膜状に固定した薄層プレートを用いる分離技術である。今回は, 先行研究をもとに抽出したポリフェノールにアントシアニンが含まれているかどうか, Rf 値を求めて確かめる。

- 1-1 展開液(n-ブタノール：酢酸：水=4：1：5)を作成する。
- 1-2 200mm × 200mm TLC プレート下部に 15 mmの余白を取るため、鉛筆で薄く線を引く。
- 1-3 TLC プレートを展開液で展開し、不純物を展開面から除き、乾燥させる。
- 1-4 乾燥後、線上にキャピラリーチューブで抽出液を 10 回スポットする。
- 1-5 スポットした抽出液を展開する。
- 1-6 展開が終わった TLC プレートを乾燥させて、Rf 値を求める。

2. 溶液中の吸光度によるアントシアニンの濃度測定 (弘前大学 岩井教授提供)

2-1 緩衝液・抽出液の調整

- 2-1-1 0.025mol/L の塩化カリウム水溶液に濃塩酸を滴下し、pH1.2(※5)に調整する＝緩衝液 1
- 2-1-2 0.40mol/L の酢酸ナトリウム水溶液に塩酸を滴下し、pH4.4(※6)に調整する＝緩衝液 2

2-2 総アントシアニン濃度測定(pH differential 法)

- 2-2-1 原液, 1.5 倍希釈, 3 倍希釈の抽出液を 2 本の試験管に 1mL ずつ採取する。
- 2-2-2 抽出液の 1 本に 0.5mL の緩衝液 1 を添加し、混合する。
- 2-2-3 もう 1 本に 0.5mL の緩衝液 2 を添加し、混合する。
- 2-2-4 2-2-2, 2-2-3 の吸光度を分光光度計で測定する。

蒸留水でゼロ合わせをしてから 520nm と 700nm の 2 つの波長で吸光度を測定する。

- 2-2-5 次の式で総アントシアニン濃度 C を算出する(シアニジン-3-グルコシド当量で算出)

緩衝液 1 の 520nm(※7)吸光度=①, 緩衝液 1 の 700nm(※8)吸光度=②,

緩衝液 2 の 520nm(※7)吸光度=③, 緩衝液 2 の 700nm(※8)吸光度=④とする。

$$C (\text{mg/mL}) = [(\text{①} - \text{②}) - (\text{③} - \text{④})] \times 449.2 (\text{g/mol}) \times \text{抽出液の希釈倍率} \div 26900 (\text{L/mol/cm})$$

449.2 : シアニジン-3-グルコシドの分子量 (g/mol)

26900 : シアニジン-3-グルコシドのモル吸光係数 (L/mol/cm)

- 2-2-6 各 3 回測定し、総アントシアニン濃度の平均値および標準偏差を算出する。

緩衝液 1 の吸光度が 0.3~0.9 の範囲になるように抽出液の希釈倍率を調整する。

※5 アントシアニン色素が pH1.2 という強酸条件下で最も安定で最も濃い有色の化学構造(フラビリウムカチオン型)を取るため。

※6 アントシアニン色素が pH4.0 という弱酸条件下で発色が最も抑制されるため。

pH1.2 の緩衝液の吸光度と pH4.0 の緩衝液の吸光度の差から正確な濃度を測定することができるため。

※7 520nm はアントシアニンが最も吸収する光の波長であるため。

※8 720nm はアントシアニンが最も吸収しない光の波長であるため。

3. 吸光度測定

- 3-1 カシス溶液とリンゴ溶液の濃度をそれぞれ 10 倍, 5 倍, 2 倍に設定したものを用意する。
- 3-2 果糖 6.5% 標準液を用いて吸光度の測定を行う。このとき、分光光度計の波長を UV-A の波長である 320 nm に設定する。
- 3-3 希釈倍率ごとに 5 回ずつデータを取り、その平均を求める。



図 1 リンゴ抽出液を作成する



図 2 実験に使用した分光光度計

5. 結果

実験 3 の TLC 法を行い Rf 値を求めて、以下の結果が得られた。

Rf 値	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	平均値
成分 1	0.442	0.405	0.394	0.394	0.400	0.407
成分 2	0.326	0.300	0.310	0.300	0.310	0.309
成分 3	0.263	0.236	0.247	0.231	0.236	0.243

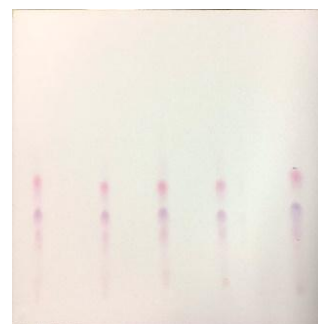


表 1 カシス抽出液の Rf 値

・実験 4 で抽出液の吸光度の測定を行い、以下の結果が得られた。

回数	1	2	3
pH1.2-波長 520nm	0.6025	0.6645	0.5560
pH1.2-波長 700nm	0.0005	0.0005	-0.0005
pH4.4-波長 520nm	-0.0015	-0.0015	0.0010
pH4.4-波長 700nm	-0.0005	0.0005	0.0005

表 2 カシス抽出液の吸光度

回数	1	2	3	4
pH1.2-波長 520nm	-0.0015	0.0015	0.0015	0.0010
pH1.2-波長 700nm	0.0005	0.0010	0.0010	0.0005
pH4.4-波長 520nm	0.0005	-0.0005	-0.0005	-0.0075
pH4.4-波長 700nm	-0.0005	0.0010	0.0005	-0.0005

表 3 リンゴ抽出液の吸光度

	1	2	3	4	5
10 倍	0.0035	0.0005	0.0025	0.0030	0.0025
5 倍	0.0075	0.0025	0.0065	0.0085	0.0025
2 倍	0.0120	0.0135	0.0135	0.0045	0.0130

表 4 リンゴ溶液の吸光度 (320 nm)

	1	2	3	4	5
10 倍	0.0300	0.0100	0.0050	0.0095	0.0195
5 倍	0.0280	0.0075	0.0180	0.0065	0.0235
2 倍	0.0080	0.0270	0.0185	0.0500	0.0060

表 5 カシス溶液の吸光度 (320 nm)

6. 考察と展望

6-1 実験 1

Rf 値	推測される色素
0.243	デルフィニジン - 3 - グルコシド (0.26)
0.309	デルフィニジン - 3 - ルチノシド (0.30)
0.407	シアニジン - 3 - グルコシド (0.38) シアニジン - 3 - ルチノシド (0.37)

・各資料の平均値を、同じ条件で行われた参考文献の Rf 値と比較してところ、溶媒前線から 2 つ目の成分の Rf 値とデルフィニジン - 3 - ルチノシドの Rf 値との誤差が 0.10 以内であったため抽出液中にデルフィニジン - 3 - ルチノシドが含まれていると考えられる。

・溶媒前線から 3 つ目の成分の Rf 値とデルフィニジン - 3 - グルコシドの Rf 値との誤差が 0.20 以内であったため、デルフィニジン - 3 - グルコシドも含まれていると考えられる。

・最も溶媒前線に近い成分の Rf 値がシアニジン配糖体の Rf 値に近いため、シアニジン配糖体も含まれていると考えられる。

→保存時に抽出液中に発生した浮遊物はアントシアニンではなく糖である可能性が高い。

・Rf 値の理論値と測定値にずれが生じているので、溶媒前線の読み取りの正確さに問題があったか、試料に用いたカシス溶液に保存性のためにクエン酸を加えていたことが影響した可能性が考えられる。

・今回の TLC での分析では、展開液以外では紫外線照射により見えない物質や溶媒前線などを確認しながら行ったが、今後は発色試薬を用いた分析や展開溶液を変更して、溶媒前線をよりはっきりさせたり、より目的の物質のみが単離できるようにしたりして、精度の高い Rf 値を求めたい。

・TLC で得られる各成分の吸光度を測定することで、より無駄のないカシス抽出液の作成を行う。

6-2 実験 2

・吸光度の測定結果より、リンゴ抽出液よりもカシス抽出液のほうが吸光度が高いため、カシスの方が紫外線を遮断しやすいと考えられる。

・カシス抽出液の中でも、pH1.2 に調整したカシス抽出液の 520nm の光の波長の吸光度が他の pH、波長に比べ、著しく高いのは、※5 にもあるように、アントシアニン色素は pH1.2 という強酸条件下で最も安定で最も濃い色素であるためだと考えられる。

回数	1	2	3
アントシアニン濃度 C(mg/mL)	0.602017	0.664033	0.566492

表 4 カシス抽出液のアントシアニン濃度

回数	1	2	3	4
アントシアニン濃度 C(mg/mL)	-0.002017	0.000525	0.000517	0.0006169

表 5 リンゴ抽出液のアントシアニン濃度

・吸光度の測定結果と、実験 4-2 の pH differential 法を用いた結果、表 4, 5 のアントシアニン濃度が求められた。カシス抽出液のアントシアニン濃度の平均は 0.61085(mg/mL)、リンゴ抽出液のアントシアニン濃度の 2~4 回目の平均は 5.53×10^{-4} (mg/mL) であった。なお、リンゴ抽出液のアントシアニン濃度の平均を求める際に 1 回目の結果を含めなかったのは濃度で負の値をとったからである。

・アントシアニン濃度が負の値として得られたのは吸光度でマイナスの値をとってしまったからであり、その理由としては、蒸留水でのゼロ合わせがうまくできていなかった、もしくは、使用したセルに汚れや傷があった、そのほか、分光光度計による直射日光が当たっていた可能性などが考えられる。

・カシスから一定量のアントシアニンを得るための定量実験を行う。

6-3 実験 3

・吸光度をわずかだが確認できたため、アントシアニンには紫外線吸収の効果があると考えられる。

・溶液作成から時間が経ってしまったため、アントシアニンの効果が弱まった可能性がある。

・標準液と抽出液の糖の濃度が異なっていた。

・市販の日焼け止めの吸光度と比較する。

7. 謝辞

今回の理数探究で助言いただきました弘前大学農学生命科学部岩井教授に御礼申し上げます。

8. 参考文献

1. 大阪教育大学「日焼け防止に最も効果的なアントシアニンを含む植物とは？」
全4ページ 2024年3月
https://f.osaka-kyoiku.ac.jp/tennoji-h/wp-content/uploads/sites/5/2024/03/proof2seitohoukokusyo_2022-70-73.pdf
2. 鹿光生物科学研究所「天然色素—アントシアニン」 2021年11月9日
https://www.rokkou-co.jp/wp/home/food_color_main/天然植物色素—アントシアニン/
3. 農林水産省 HP 全85ページ P40, 41, 112
https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_sehi_kizyun/pdf/miyagi_kaju5_06.pdf
4. 平成26年度岩手農業研究センター試験研究成果書
https://www.pref.iwate.jp/agri/_res/projects/project_agri/_page_/002/004/220/h26shidou_21.pdf
5. 食品微生物学 エタノール殺菌とその殺菌メカニズム
<https://foodmicrob.com/ethanol-basic/>
6. 独立行政法人 青森県産業技術センター(加熱処理がカシスアントシアニンに与える影響)
全2ページ 2009年 3月
https://jspp.org/hiroba/q_and_a/detail.html?id=1942
7. 沖智之, 澤井祐典, 古川(佐藤)麻紀, 須藤郁夫: 紫黒米・黒大豆中の総アントシアニンのpH differential 法による定量とその試験所間比較による妥当性確認. 分析化学, 60(10), 819-824, 2011.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/60/10/60_10_819/_pdf/-char/ja
8. 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所 中山真義
「化合物の分離と混合を同時に行う交差TLC法の開発」 2015年 全6ページ
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsrpp/50/2/50_KJ00010115797/_pdf/-char/ja
9. 飯田女子短期大学 平井俊次, 千裕美, 近藤民恵, 川俣幸一
「加熱処理が果実のポリフェノール化合物に与える影響」
<https://cir.nii.ac.jp/crid/1050282813868221696>
10. 京都府立大学学術機関リポジトリ 牧 善輔, 稲本 英子
桑の実のアントシアニン色素 1972年10月 全4ページ
<https://kpu.repo.nii.ac.jp/record/files>
11. 「紫サツマイモのアントシアニン分析法」国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター 沖智之 全11ページ
<https://www.fmric.or.jp/ffd/ffmanual40104.pdf>