



小角 X 線散乱を用いたバラシロップの色素安定性評価

勝野那嘉子¹, 中西未佳¹, 佐藤玲菜², 西津貴久¹

1 岐阜大学応用生物科学部, 2 ココノエフーズ株式会社

キーワード：アントシアニン, 小角・広角 X 線散乱, 色素安定性

1. 測定実施日

2018 年 6 月 26 日 BL8S3 (1 シフト)
2018 年 6 月 28 日 BL8S3 (1 シフト)
2018 年 10 月 16 日 BL8S3 (1 シフト)
2018 年 10 月 19 日 BL5S2 (1 シフト)

2. 概要

バラシロップの色素安定性を小角・広角 X 線散乱法によって評価することを試みた。バラシロップの糖濃度を高めると色素安定性が高まるが、それに伴って散乱プロファイルも変化することが明らかとなった。また、アントシアニン溶液の濃度を変え測定したところ、濃度の増加に伴って、アントシアニンのスタッキングに起因すると推定される回折ピークが認められた。

3. 背景と研究目的

バラシロップは、ギフト用に購入されることが多く、外観の良さが最も重要である。バラシロップに用いられる赤系バラ花卉の色素成分は、アントシアニンの一種であるシアニジングルコシドである。アントシアニン含有食品の問題点として、アントシアニンの安定性が低いことによる保存中の退色が挙げられる。そのため、アントシアニンを安定化させることは、商品開発において重要課題となる。シロップやジャムの賞味期限が 1 年である場合、色素の安定性を確認するために 1 年以上の保存試験が必要となり、商品開発には長期間を要する。そこで保存試験を行うことなく、アントシアニンの安定性を予測することができれば、商品開発期間の短縮につながる。しかし、現在、アントシアニンの安定性を保存試験以外の方法で評価できる手法はない。

アントシアニンは、分子同士が自己会合することで安定性が向上することが知られており^[1]、製品中のアントシアニンの自己会合状態を把握することができれば、保存時の安定性予測に役立つと考えられる。そこで、本研究では小角・広角 X 線散乱法を用いて、アントシアニンの自己会合状態を解析し、安定性を評価する方法を確立することを目的とした。

4. 実験内容

バラシロップに含まれるアントシアニンの自己会合状態を評価するために、小角・広角 X 線散乱測定を行った。先行研究から、バラ抽出液に 60% のショ糖を添加すると色素が安定化することが明らかになっていたため^[2]、ショ糖濃度が 0, 20, 40, 60% になるようにバラ抽出液にショ糖を添加した溶液を測定に用いた。バラ抽出液は、色素成分以外にも様々な成分が含まれることから、色素以外の成分の影響を排除するために、バラシロップの色素とアグリコンが同じであるシアニジン-3-グルコシドのみを色素とした溶液を作製し、測定に用いた。また、アントシアニンは濃度が濃くなると自己会合し、安定化することが知られていることから^[1]、シアニジングルコシド濃度を変えた溶液を作製し測定に用いた。これらの試料は、φ2 mm の石英キャピラリーに充填し、小角・広角 X 線散乱測定を行った。測定は、あいちシンクロトロン光センターの BL8S3 で行った。初めに測定カメラ長を決定するため、0.2 m または 4 m のカメラ長、波長 1.5 Å で測定を行った。検出器には R-AXIS を用いた。試料によってカメラ長 0.2

m の散乱曲線に違いが認められたことから、カメラ長は 0.2 m を用いることとした。得られた散乱曲線は、バックグラウンドとして、各試料の溶媒（シアニジングルコシドまたはバラ成分を含まない糖濃度の異なる溶液）の散乱曲線を差し引きした。また、微細な自己会合構造を把握するため、あいちシンクロトロン光センターの BL5S2 にて X 線回折測定も合わせて行った。測定試料は、小角・広角 X 線散乱測定と同じものを用いた。検出器は PILATUS100K を 4 台用いを用い、波長 1 Å で測定した。

5. 結果および考察

5.1 X 線回折

アントシアニンの微細な自己会合構造を把握するために、バラ抽出液を用いて X 線回折測定を行った。バラ抽出液において、ショ糖濃度 0% の溶液では、 $2\theta = 10^\circ$ 以下の領域にピークが認められなかったが、ショ糖を添加すると 2θ が $3.5^\circ \sim 7^\circ$ にピークが観察された（図 1）。この結果から、バラ抽出液中には、8–10 Å の規則性のある構造があり、その構造は糖濃度によって変化することが示唆された。すべてのサンプルにおいて、 20° 以上の領域の回折パターンに違いは認められなかった。

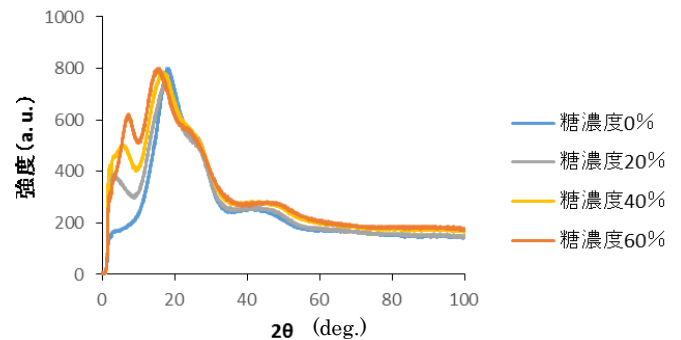


図 1 糖添加濃度の異なるバラ抽出液の X 線回折パターン

5.2 小角・広角 X 線散乱測定

糖含量を変えたバラ抽出液の小角・広角 X 線散乱曲線を図 2 に示す。糖濃度 0% のバラ抽出液の散乱曲線には、 15nm^{-1} のピークがあり、そのピークの q 値は糖濃度が 0% から 40% に増加するに従って高 q 側へシフトしたが、40% から 60% に糖濃度が増加すると低 q 側にシフトした。また、バラ抽出液中のショ糖濃度が 40% になると q 値が 5nm^{-1} 付近に極大を持つピークが現れ、さらに糖濃度が 60% になると、そのピーク強度が大きくなり、高 q 側へシフトした。これらのピークが、バラ抽出液の色素成分であるシアニジン配糖体によるものであるかどうかを確かめるために、シアニジングルコシド溶液を用いて、シアニジングルコシドの濃度を変えて測定を行った。

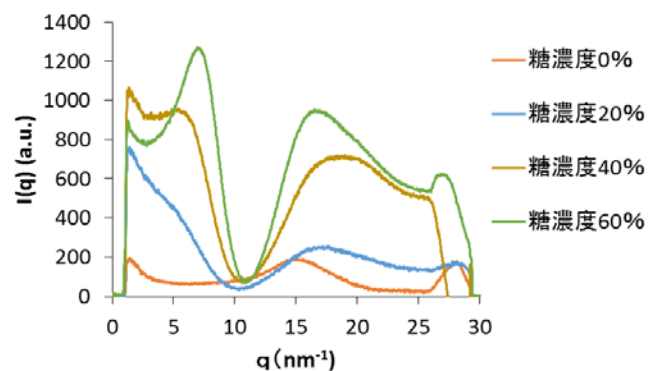


図 2 糖添加濃度の異なる抽出液の小角および広角 X 線散乱曲線

シアニジングルコシド濃度が 8.25×10^{-5} M の溶液は、バラ抽出液中の色素成分と同濃度の溶液である。 8.25×10^{-5} M の溶液では、 q 値 20nm^{-1} 付近に緩やかなピークが確認された（図 3）。ショ糖を添加していないバラ抽出液の極大ピークの q 値 15nm^{-1} より高 q 側であった。このピークは、濃度の増加に伴って低 q 側へシフトし、さらに 8.3×10^{-2} M の溶液では、 q 値 18nm^{-1} 付近に明瞭なピークが出現した。この時の構造の大きさは 3.4Å であった。アントシアニン的一种であるコンメリニンにおいて、スタッキングの母核どうしの間隔は、最も近いところで 3.5Å であることが報告されている^[3]。また、一般的な π - π スタッキングの距離は 3.3Å と報告されている^[4]。このことから、 q 値 18nm^{-1} 付近のピークはアントシアニンのスタッキングによるものである可能性がある。濃度が最も濃い溶液については、さらに q

値 5 nm^{-1} 以下にピークがあり，シアニジングルコシドが大きな凝集体を形成している可能性が示唆された。

次に，ショ糖を 60% 含むシアニジングルコシド溶液を用いて，小角・広角 X 線散乱測定を行った。糖を全く含まないシアニジングルコシド溶液の散乱曲線と異なり， q 値が $7\text{--}12 \text{ nm}^{-1}$ に極大ピークが認められた（図 4 矢印 1–3）。また，このピークはシアニジングルコシド含量が高くなるにしたがって高 q 側へシフトしており，糖の存在下で，溶液中のシアニジングルコシドの濃度が高まると，シアニジングルコシドの存在状態が変化することが示唆された。シアニジン濃度が低濃度ではバラ抽出液の散乱曲線を再現していたが，高濃度のシアニジングルコシドに認められたピーク 2，3 は，バラ抽出液で認められた低 q 側のピーク (q 値 $5\text{--}7 \text{ nm}^{-1}$) と一致していなかった。このことから，バラ抽出液の安定性を評価する際，アントシアニンの濃度依存性をみるためには，バラ抽出液の濃度を変えた溶液での測定も必要であると考えられる。

バラ抽出液中の色素は，高濃度の非還元糖が存在すると安定性が向上するが^[2]，今回の測定において糖濃度が高まると出現した q 値 $5\text{--}10 \text{ nm}^{-1}$ のピークと色素安定性との関係

は明らかにならなかった。一方， q 値が $15\text{--}20 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークは，報告されているアントシアニンのスタッキング距離と近く，安定性評価に利用できる可能性がある。しかし， q 値が $15\text{--}20 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークがスタッキングによるものであることを確認するためには，さらなる検討が必要である。

6. 今後の課題

q 値が $15\text{--}20 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークが，安定性に関与している可能性が示唆されたが，アントシアニン分子同士のスタッキングによるものであることを確認するまでには至らなかった。そこで，今後は，アグリコンを変えたアントシアニンや添加する糖を変えた溶液を用いて，散乱曲線の変化と色素の安定性の関係を検討する。

バラ抽出液の散乱曲線は，シアニジングルコシドのみを色素に含む溶液の散乱曲線と異なっており，バラ抽出液に含まれる色素以外の成分もアントシアニンの安定性に影響していることが予想された。バラに含まれる他の成分としてフラボノイド類が考えられるため，今後は，安定化に寄与する他の成分を同定し，シアニジン配糖体と他の化合物を添加した系で散乱プロファイルの変化を検討し，安定性との関係を明らかにすることを目指す。

5. 参考文献

1. 津久井亜紀夫，寺原典彦．アントシアニンと食品—アントシアニン含有食品の加工利用特性と機能性—，p28. 建帛社，2015.

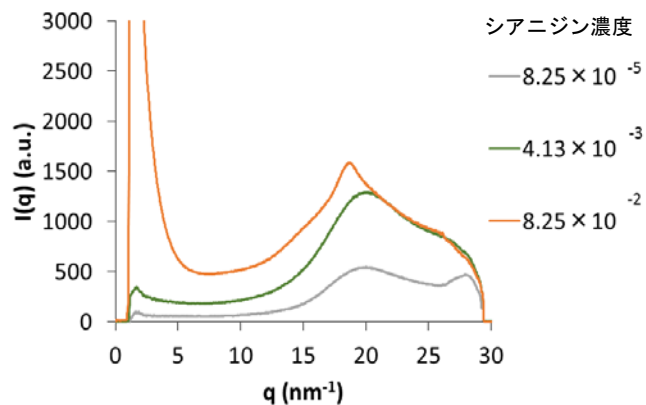


図 3 シアニジングルコシド濃度を変えた溶液（糖濃度 0%）の小角および広角 X 線散乱曲線

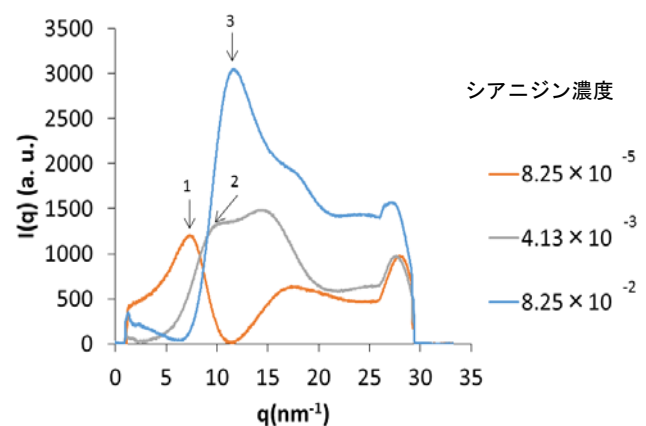


図 4 シアニジングルコシド濃度を変えた溶液（糖濃度 60%）の小角および広角 X 線散乱曲線

2. 佐藤玲菜ら. 日本食品科学工学会第 64 回大会要旨集, 2017.
3. 吉田久美. 精密構造認識に基づくアントシアニンの分子会合. 名古屋大学博士論文, 1992.
4. Trouillas, P. et al. Stabilizing and Modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical Reviews*, 116, 4937-4982, 2016.