

200837059A

厚生労働科学研究費補助金  
健康安全確保総合研究分野  
食品の安心・安全確保推進研究事業  
H20・食品一若手 022

既存添加物・褐色系フラボノイド色素群の化学構造の解明

平成 20 年度総括報告書 (2 年間のうち 1 年目)

主任研究者 伊藤裕才 国立医薬品食品衛生研究所  
平成 21 年 4 月

## 目次

3	研究概要
5	研究目的
9	1) 主要褐色系フラボノイド色素の UV-Vis スペクトル分析および LC/MS 分析
11	2) 黄色タマネギ皮からの黄色色素の単離・構造決定
15	3) Cepaic acid の生成過程の検証
18	4) 濾紙電気泳動法を用いた褐色色素の判別法の検討
20	図表

## 研究概要

総括および主任研究者：伊藤裕才

既存添加物には着色料として数多くのフラボノイド色素が登録されているが、その大半は赤色—紫色を呈するアントシアニン系の色素である。それ以外に褐色を呈するものフラボノイド色素として、カカオ色素など 8 種類が存在する。これらは、カカオからタマネギまで幅広い種類の原材料から抽出されるが、いずれも水溶性が高くかつ熱や光に対して安定でタンパク質への染色性が高いことから、チョコレートなどの菓子製品から肉製品、水産練り製品まで広く用いられている。これら褐色色素は「フラボノイド色素」と称されるものの、原料に多くのフラボノイドが含まれているだけであって、色素そのものがフラボノイドであるという化学的な証拠には乏しい。

そこで今回、これら褐色系フラボノイド色素について色素本体の化学構造にせまることを目的とし、まず市場に多く流通している 5 種の褐色色素（カカオ色素、カキ色素、コウリヤン色素、タマネギ色素、タマリンド色素）の逆相系 LC/MS を用いた成分確認と紫外可視光域の吸収スペクトルを確認した。次に比較的原料が入手しやすいタマネギを試料として褐色色素の単離と構造決定を行った。タマネギ色素は黄色タマネギの乾燥した鱗茎（外皮）から含水エタノールまたは弱アルカリ水溶液で抽出されたものを言う。今回、乾燥外皮を 10%エタノールで抽出し、その抽出液から LC/MS による色素成分の探索を行い、溶媒分画とオープンクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて、1,3,6,8-tetrahydroxanthylum 構造をもつ分子量が 289 の黄色色素の構造決定に至った。この色素は酸性水溶液中で 430 nm に極大吸収を持ち、これまでに知られていない有機化合物であったため *cepaic acid* と命名された。

タマネギ外皮から得られた *cepaic acid* の構造は 2 分子のプロログルシノールがグリオキシル酸によって架橋され、脱水反応と酸化反応によって生成したものと仮定された。実際にプロログルシノールとグリオキシル酸を水溶液中で攪拌すると、*cepaic acid* と LC/MS 分析で確認された色素の大きなブロードピークの生成が確認された。プロログルシノールはタマネギの鱗茎に多量に含まれているクエルセチンの自然酸化による分解物であり、タマネギの再外殻の鱗茎に含まれるクエルセチンが乾燥とともに酸化分解し、生成した強力な求核試薬でもあるプロログルシノールがグリオキシル酸のようなアルデヒド類と反応して *cepaic acid* のようなキサンチリウム色素が発生するのではないかと考えられた。アルデヒド類としてアセトアルデヒドとホルムアルデヒドをプロログルシノールと混合して攪拌したが、アルデヒドによるプロログルシノール間の架橋は確認されたが、グリオキシル酸のようにキサンチリウム色素が生成することはなかった。ここにアルデヒド類としてのグリオキシル酸の特殊性が強く示唆された。グリオキシル酸の由来が何なのかは今後の研究の大きな課題である。

最後にタマネギ皮から単離された cepaic acid が正の電荷を帯びていることから、分光学的に差異のない各褐色色素群を電気化学的な側面から差別化できるかもしれないと考え、濾紙電気泳動による色素の移動度を確認した。上で述べた5つの褐色色素は全て陰極側へと移動したものの、その移動度に大きな差異はみられなかった。しかしながら、この結果は褐色色素が正に帯電していることを示唆するものであり、褐色色素群の化学構造の考察に役立つものであった。

学会発表：第14回日本食品化学学会学術大会：「既存添加物タマネギ色素における色素生成メカニズムの考察」伊藤裕才・山崎壮・伊藤澄夫・棚元憲一（平成20年5月29日）

誌上発表：*Tetrahedron Letters* in press

## 研究目的

褐色系フラボノイド色素として、既存添加物には「カカオ色素」、「カキ色素」、「クローロ色素」、「コウリヤン色素」、「シアナット色素」、「タマネギ色素」、「タマリンド色素」、「ペカンナツ色素」の8種が存在する。これら色素は、基本的に水溶性であり、光や熱に安定で染色性も高いことから、着色料として使用頻度が非常に高い。驚くべき事に、主色素はフラボノイド類であると規定されていながら、その化学構造は未解明である。それゆえ規格も設定されていない。解明が遅れている一因は、これら褐色系色素はどれも高分子化合物であり、従来の分画方法では、単一成分として単離・精製することが極めて難しいことにある。そもそも色素本体が、記載されているようなフラボノイドなのであるかという疑問さえもある。確かに原料の植物にはフラボノイド類が多く含まれているが、フラボノイド類は酸性—中世条件下では無色か淡黄色であり（アントシアニン（赤紫色）を除く）、褐色を呈してはいない。そのため化学変化による「褐変」によって、もともとのフラボノイドの構造が大きく変化している可能性が高い。これら褐色色素は、原料の植物からただ抽出されるだけではなく、製品化されるまで幾つかの工程を経るものが多い。例えば「カカオ色素」「タマリンド色素」等は、製造工程に「発酵」さらに「焙焼」という高熱を加える過程がある。そのため、原料に含まれる成分組成は大きく変化されていると考えるべきであり、その過程において色素も生成さ

れてきた可能性が高い。それゆえ、研究方法は、添加物そのものの分析だけでなく、その製法との2面から進めることを考えている。フラボノイドの非酵素的褐変機構については、未知の部分が非常に多く、本研究はその解明にも役立つと考える。

食品の安全性に対する国民の関心は高く、成分組成が不明な食品添加物を摂取することは、もはや許されざる状況となってきた。チョコレートの色であるカカオ色素のように、身近な色素群である褐色系フラボノイド色素の化学性状が不明なことは驚くべきことであり、解明することが急務と考えられたため、本研究を遂行した。

これら8種の褐色系フラボノイド色素は、既存添加物名簿収載品目リストにおいて以下のように説明されている。

1)カカオ色素（カカオの種子から得られた、アントシアニンの重合物を主成分とするものをいう。）

基原・製法・本質：アオギリ科カカオ（*Theobroma cacao* LINNE）の種子（カカオ豆）を発酵後、焙焼したものより、温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はアントシアニンが熱により重合したものである。褐色を呈する。

概要：本品はカカオ豆に含まれるエピカテキン、ロイコアントシアニン、カテキン、アントシアニン等が発酵、ばい焼等の課程において複雑に変化して生成し

たフラボノイド系色素である。水溶液はチョコレート色を呈す。可視部吸収曲線は短波長側から長波長側へなだらかに低下する。耐熱性、耐光性は極めて良好である。原料であるカカオ豆は、ガーナ、ブラジル、アイボリーコースト等で生産される。

2) カキ色素 (カキの果実から得られた、フラボノイドを主成分とするものをいう。)

基原・製法・本質：カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。赤褐色を呈する。

概要：本品は、フラボングループに属するロイコデルフィニジン、ロイコシアニジンやカテキン等が縮合したフラボノイドを主成分とする赤褐色色素である。原料であるカキは主に、国内 (和歌山、奈良地方) で生産される。本色素は弱酸性～アルカリ性で安定で、また熱や光に対する安定性が非常に高いために水産加工品、麺類、菓子等に広く使用されている。

3) クーロー色素 (ソメモノイモの根から抽出して得られたものをいう。)

基原・製法・本質：ヤモノイモ科ソメモノイモ (*Discorea matsudai* HAYATA) の根より、熱時水、弱アルカリ性水溶液若しくはプロピレングリコールで抽出したもの、又は室温時含水エタノールで抽出して得られたものである。赤褐色を呈する。

概要：本品はフラボノイド系色素 (フラバ

ノール型タンニン、カテキンやロイコアントシアニンなどの会合型タンニン、縮合型タンニンなど) を主成分とする赤褐色の色素である。原料のソメモノイモは主として沖縄、台湾などに産し、暗褐色の大きな地下茎から微アルカリ水、プロピレングリコールやエタノールを用い色素成分を抽出する。耐熱・耐光性は良好で、染着性が優れているので、ハム・ソーセージなどの畜肉加工品、水産加工品や総菜類にも使用される。通常はプロピレングリコールやエタノールを含む液体製品として利用される。

4) コウリヤン色素 (コウリヤンの種子から得られた、アビゲニジン及びビルテオリニジンを主成分とするものをいう。)

基原・製法・本質：イネ科コウリヤン (*Sorghum nervosum* BESS.) の実及び殻より、温時～熱時水、含水エタノール若しくは酸性含水エタノールで抽出して得られたもの、又は室温時～温時アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はアビゲニジン及びビルテオリニジンである。赤褐色を呈する。

概要：本品は、フラボノイド系のアビゲニジン及びビルテオリニジンを主成分とする赤褐色色素である。イネ科ソルガム属のモロコシ (通称コウリヤン、トウキビ、タカキビ、キビ) は、アジア南西部、アフリカ、中国東北部が主産地であり、これら地域では小麦、トウモロコシ等に次ぐ重要な穀物である。又飼料としても広く利用されている。産地に殻の色調から赤色、黒色のものの2タイプに大別されるが、ほぼ同一地域で栽培されるため交雑が起こり中間的の色調が交わることもある。原料の品種及び抽

出方法の違いにより色調及び溶解度が異なる場合がある。本色素は中～アルカリ性で赤褐色～褐色を呈する。耐光性、耐熱性に優れ、たん白質への染着性が良いためハム、ソーセージ類、菓子、麺類、水産加工品等に使用されている。

5) シアナット色素 (シアノキの果実又は種皮から抽出して得られたものをいう。)

基原・製法・本質：アカテツ科シアノキ (*Butryosprum parkii* KOTSCHY.) の果実又は種皮より、室温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。褐色を呈する。

概要：本品はフラボノイド系色素と推定されているが、その主成分の構造は未決定である。アカテツ科シアノキの果実種子 (シアナット, Sheanut) はナイジェリアを中心とする西アフリカの北緯 5° ~ 15° の地帯に産する。その油分はシア脂と称され種子中 42~50% 含まれており、製菓原料として使われている。粕は飼料用増量剤としても利用されている。本色素はシアナット種子から压榨もしくは溶剤によってシア脂を採取した残渣より抽出して得られ、酸味を帯びた特有の臭いを有する。タンパク質への染着力は弱い、耐光性、耐熱性に優れているため、他の褐色系色素の増強剤に使われることが多い。単品としてはハム、ソーセージ類のケーシング用の食用着色剤として使用されている。一般に液体製品は安定化のためエタノール等を含む。

6) タマネギ色素 (タマネギのりん茎から得られた、クエルセチンを主成分とするものをいう。)

基原・製法・本質：ユリ科タマネギ (*Allium cepa* LINNE) のりん茎より、温時～熱時水若しくは含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時～熱時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はクエルセチンである。黄色を呈する。

概要：本品はフラボノイド色素で褐色の色素である。フラボノイド系のクエルセチンを主成分としているが、その他未同定の成分もある。本色素は酸性で不溶化するため、中性～アルカリ性で使用される。耐熱性、耐光性は非常に優れており、また、染着性も非常によい。ハム、ウィンナーソーセージ等の畜肉加工品の外染に使用すると、やや赤味の褐色となり、色流れなど無く安定した色合いとなる。

7) タマリンド色素 (タマリンドの種子から得られた、フラボノイドを主成分とするものをいう。)

基原・製法・本質：マメ科：タマリンド (*Thamarindus India* LINNE) の種子を焙焼したものより、温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。赤褐色を呈する。

概要：本品は、フラボングループに属するカテキン、ロイコアントシアニン、アントシアニン等が縮合したフラボノイドを主成分とする赤褐色色素である。原料であるタマリンドインディカの種子は主にインド地方で生産される。本色素は弱酸性～アルカリ性で安定で、また熱や光に対する安定性が非常に高いために水産加工品、麺類、菓子等に広く使用されている。

8)ペカンナッツ色素 (ピーカンの果皮又は渋皮から得られた、フラボノイドを主成分とするものをいう。)

基原・製法・本質:クルミ科ピーカン(*Carya pecan* ENGL. et GRAEBA.)の果皮又は渋皮より、熱時水若しくは含水エタノールで抽出して得られたもの又は熱時酸性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。褐色を呈する。  
概要:本品はフラボノイド系色素を主体とする色素であり、落葉性高木のクルミ科カリヤ属ペカンの果皮及び渋皮より得られ、アメリカニューメキシコ州の南～南西部、或いはオーストラリアのニューサウスウェールズ州が主産地である。元来、アメリカインディアンの常備食として利用され、今日ではクッキー、アイスクリーム、ケーキ等の製菓原料やスナックナッツ、或いは惣菜用等広く用いられている。本色素はpHによる色調の変化は少なく、酸性～アルカリ性で赤褐色～暗褐色を呈する。タンパク質への染着力は比較的良く、酸性領域でも先着することを特徴とする。

## 1: 主要褐色系フラボノイド色素の UV-Vis スペクトル分析および LC/MS 分析

### A 研究目的

褐色系フラボノイド色素の比較的流通量の多い5種(カカオ色素、カキ色素、コウリヤン色素、タマネギ色素、タマリンド色素)についての基礎的な物性および成分構成を把握するために、紫外可視光スペクトル分析を行い、逆相系カラムを用いた LC/ESI-MS による成分分析を行った。

### B 研究方法

#### 試料

- ・ カカオ色素 (3種: 和光純薬製品、関東化学製品、三栄源 FFI 製品)
- ・ カキ色素 (1種: 関東化学製品)
- ・ コウリヤン色素 (1種: 三栄源 FFI 製品)
- ・ タマリンド色素 (1種: 三栄源 FFI 製品)
- ・ タマネギ色素 (1種: 三栄源 FFI 製品)

これら試料を 0.1mg/mL となるように MilliQ 水に溶解させて分析試料とした。

#### 紫外可視光吸収スペクトル分析

- ・ 機器: 日本分光社製 V-650 分光光度計
- ・ セル: 石英セル, セル長 1 cm
- ・ 溶媒: MilliQ
- ・ 走査範囲: 300 nm ~ 700 nm

#### LC/MS 分析

- ・ 機器: Waters LC/MS system
- ・ LC: Waters 2695 alliance
- ・ MS: Quattro micro

- ・ PDA: Waters 2996
- ・ Column: nacalai tesque社製 COSMOSIL C<sub>18</sub>-MS-II (4.6 × 250 mm)
- ・ 移動相: A 0.1%ギ酸入りH<sub>2</sub>O, B 0.1%ギ酸入りアセトニトリル
- ・ Gradient条件: B移動層10%~100% for 30 min
- ・ PDA検出範囲(190 nm~600nm)
- ・ ESI-MS: 正イオンおよび負イオンモード、Cone電圧=10, 30, 60 V

### C 研究結果

市販の5種・7製品の褐色系フラボノイド色素(カカオ色素、カキ色素、コウリヤン色素、タマリンド色素、タマネギ色素)を MilliQ 水に溶解させた。溶液の色調、はやや黒くくすんだ茶褐色であり、コウリヤン色素は若干ではあるが赤味があった色調であったが、一見して判別することは不可能なほどに酷似していた。(Fig. 1)。これら溶液の紫外可視光吸収スペクトル分析を行ったところ、Fig. 2 に示すような吸収スペクトルが得られた。どのスペクトルも 350 nm 近辺からなだらかに高波長側に向かって傾斜し、500nm 近辺に非常に緩やかな盛り上がりを形成していた。これら各色素のスペクトル間においても特直的な差違がなく、スペクトルを用いて色素を判別することは不可能であった。またカカオ色素においては製品間に若干であるが級友曲線の差違があった。これは材料・製法によつ

て色調に差がでることを示唆するものであった。

次に汎用的な  $C_{18}$  系の逆相カラムを用い、移動相としてギ酸入りの水/アセトニトリル系を用いて HPLC 分析を行った。TIC として 190~600 nm の吸収値合計および黄色色素の指標として 450nm での検出を行ったところ、全ての色素製品において黄色色素はクロマトグラムの中程になだらかなブロードピークを形成した (Fig. 3)。TIC で検出したところ、各色素にはやや特徴的なピークの存在が確認された。カカオ色素 (3) およびカキ色素、タマリンド色素には約 12 min に 260 nm と 294 nm に極大吸収を持つピークを確認した。このピークを負イオンモードの ESI-MS 分析で測定した結果、 $m/z$  153 にイオンピークが観測されたことから、このピークは 3,4-dihydroxybenzoic acid (1, DHBA) であると推定され、市販の標品を用いた LC/MS 分析との比較から確認された。DHBA はこれまでもフラボノイドの酸化分解物として多数報告がある物質である。例としては、クエルセチンやカテキンの B 環に相当する。この他、コウリヤン色素においては、TIC 測定で 22.17min にピークが観測され、ESI 正イオンモード分析において  $m/z$  271、負イオンモードにおいて  $m/z$  269 にイオンピークが観測され、分子量 270 の物質であることが示唆された。

これらの結果から、褐色色素製品を目視や UV-Vis スペクトルおよび LC/MS による成分分析で差別化を図ることは難しいことが改めて判明した。特に LC/MS による成分分析は色素は幅広い極性範囲でブロードなピーク形状を示し、繰り返しの構造による複雑な高分子であると推定された。しかし

ながら、起源植物がタマネギからカカオとるように広範でありながら、得られてくる色素の性状に差違を見つけるのが難しいという事実は、褐色色素の化学構造はフラ起源植物に含まれていたフラボノイドのような成分が、ある一定の化学反応による変化によって生じる類似した化合物である可能性を示唆した。

## 2: 黄色タマネギ皮からの黄色色素の単離・構造決定

### A 研究目的

褐色色素の化学構造解明への第一歩として、既存添加物「タマネギ色素」を研究対象とした。黄色タマネギの乾燥外皮から得られる黄色い色素は、食品添加物としてだけでなく、染料としても民間での使用の歴史が長く、日本人にとっては身近な色素である。タマネギ色素の色素本体は、タマネギ鱗茎に含まれるフラボノイドであるクエルセチン (2, quercetin) であると言われているが、酸性から中性条件において2は可視光帯の吸収を殆ど持たず淡い黄色であるため、450nm以上に吸収帯をもつタマネギの黄色色素を説明できない。そこで、今回、黄色タマネギの乾燥外皮を抽出し、LC/MSやNMR等に分析機器を用いて色素の単離・構造決定を行った。

### B 研究方法

試料: 黄色タマネギの乾燥外皮(20 g)

試薬: オープンクロマトグラフィー用C<sub>18</sub>樹脂 ODS-A, 120-S150 (YMC-GEL)、3,4-dihydroxybenzoic acid (1, Aldrich)、トリメチルシリルジアゾメタンヘキサン溶液 (Trimethylsilyldiazomethane, ca. 10% in Hexane, ca. 0.60 mol/L)、塩酸—メタノール試薬(5~10%) (東京化成)

抽出方法: タマネギの乾燥外皮をフードプロセッサーでできる限り細かく粉碎後、10%エタノール(1L)を加えて3時間室温で攪拌した。攪拌後、三角コーナー用

の水切りを用いて残渣を除去すると、濃い橙色を呈した抽出液が得られた。この抽出液は、0.2 $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過後、以下のような条件でLC/ESI-MS分析へと供された。

#### LC/ESI-MS 分析条件

- 機器: Waters LC/MS system
- LC: Waters 2695 alliance
- MS: Quattro micro
- PDA: Waters 2996
- Column: nacalai tesque社製 COSMOSIL C<sub>18</sub>-MS-II(4.6 x 250 mm)
- 流量: 0.5 mL/min
- 移動相: A 0.1%ギ酸入りH<sub>2</sub>O, B 0.1%ギ酸入りアセトニトリル
- Gradient条件: B移動層10%~100% for 30 min
- PDA検出範囲(190 nm~600nm)
- ESI-MS: 正イオンおよび負イオンモード、Cone電圧=10, 30, 60 V

単離スキーム: タマネギ外皮から得られた抽出液を減圧濃縮しエタノールを除去した。続いて抽出液に*n*-ブタノールを加え二層分配を行ったところ、黄色色素は水層に留まった。次にこの水層に濃塩酸を加え酸性条件(pH<1)にし、改めて*n*-ブタノールを加えて二層分配を行ったところ、黄色色素はほぼ完全にブタノール層へと移行した。ブタノール層を減圧濃縮し乾固後、得られた固体を0.05%TFA入り水溶液に溶解し、メタノ

ール、50%メタノール、25%メタノール、および0.05%TFA入り水溶液で安定化させたフラッシュODSクロマトグラフィに負荷した。0.05%TFA入り水溶液、0.05%TFA入り10%メタノール溶液、0.05%TFA入り30%メタノール溶液、0.05%TFA入り50%メタノール溶液、0.05%TFA入りメタノール溶液(各500 mL)で順次溶出させた。0.05%TFA入り10%メタノール溶液画分を減圧濃縮後、凍結乾燥し、得られた固体を0.05%TFA入り10%メタノール溶液に溶解させ、分取HPLCに負荷し、cepaic acid (3) を分取した。得られた画分を凍結乾燥し、cepaic acidを5.2 mg得ることが出来た。

#### 分取HPLC条件

- ・ 機器: Shimadzu SCL-10Avpシリーズ
- ・ Column: nacalai tesque社製 COSMOSIL C<sub>18</sub>-MS-II(20 x 250 mm)
- ・ 流量: 7.0 mL/min
- ・ 移動相: A 0.05%TFA入りH<sub>2</sub>O, B 0.05%TFA入りアセトニトリル
- ・ PDA検出: 450 nm
- ・ Gradient条件: B移動層10%~35% for 15 min

試料は手でインジェクトされ、cepaic acidは450 nmの吸収と保持時間を確認することで手で分取した。

#### NMR分析

- ・ 機器: 日本電子(JEOL)社製 ECA-500
- 試料をNMR測定用のDMSO-*d*<sub>6</sub>(nacalai tesque社製): TFA(9:1) 溶媒に溶解し、直径5 mmの測定用ガラス管に封入し25℃で測定した。

#### C 研究結果

黄色タマネギの乾燥外皮を粉碎し、含水エタノールで抽出した結果、橙色の抽出液が得られた。この抽出液をLC/MSで分析したところ、quercetin (2) およびその配糖体および、2の酸化分解物であると考えられる3,4-dihydroxybenzoic acid (1)のピークを確認することができた(図4)。黄色色素を検出するために450 nmで検出したところ、高極性付近に鋭いピークAを観測し、その後方に広範囲にわたるブロードピークを確認した。ピークAのUV-Vis spectrumは430 nmに極大吸収を示した(図5)。ピークAのESI-MS分析では、正イオンモードで *m/z* 289、負イオンモードで *m/z* 287 に分子関連イオンピークを観測した(図6)。この結果から、ピークAの物質(3)の分子量は、288前後であることが示唆され、またピークAの後方にブロードピークとして観測された複雑な高分子と考えられる黄色色素群の最小ユニットに相当するのではないかという仮説が得られた。

そこで、3の化学構造を決定するために、得られた抽出液から3の単離精製を試みた。三角コーナー用の水切りを用いてタマネギ皮の残渣を取り除いた後、抽出液中のエタノールを減圧下で除去し、えら得た水溶液に*n*-ブタノールを加えて二層分配を試みた。その結果、黄色色素は完全に水層へと留まった。続いて水層に塩酸を加えて酸性(pH<1)にし、改めて*n*-ブタノールで抽出を試みたところ、黄色色素は完全に*n*-ブタノール層へと移行した(図7)。この結果は、色素がカル

ボン酸のようなプロトネーションを受ける官能基を含んでいることを示唆した。色素を含む $\alpha$ -ブタノール層を減圧濃縮し、得られた固形物を逆相のフラッシュカラムクロマトグラフィーに負荷し、0.05%TFA含有の含水メタノールで順次溶出させたところ、0%メタノール溶液では色素は溶出されなかったが、メタノール濃度が増加するにつれ黄色色素が溶出されていった。LC/MSを用いて3が溶出された画分を確認したところ、10%メタノール画分に溶出されていることが判明した。それゆえ、10%メタノール画分を減圧濃縮し、C<sub>18</sub>系カラムを用いた逆相系の分取HPLCによって3を精製した。得られた3を含むフラクションを凍結乾燥に付し、3を橙色の粉末として5.4 mg 得ることができた。得られた3をDMSO-*d*<sub>6</sub> : TFA (9:1) に溶解させ<sup>1</sup>H-NMRで測定したところ、6.43 ppmと6.63 ppmの2つだけピークを確認した(図8)。これらのピークは $J=2.3$  Hzのカップリング値を示したため、芳香環上のメタ位同士の関係であると考えられた(表1)。3の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは8つのピークを示した(図9)。それらのうち、化学シフトの値から酸素原子が隣接していると思われる炭素原子が3つ、および炭素-炭素結合が4つ、カルボン酸と考えられる炭素が1つ観測された(表1)。<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMQC分析を行ったところ、二つの水素原子(6.63 ppmと6.43 ppm)に対応する炭素原子(96.3 ppmと101.1 ppm)を同定することができた。次に<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMBC法で分析したところ、6.63 ppmの水素原子から、162.3 ppmお

よび172.8 ppmへの相関が観測された。同様に6.46 ppmの水素原子から、158.8 ppmと172.8 ppmへの相関が観測された。またこれら二つの水素原子から105.6 ppmの炭素原子への相関も観測された。これらの相関は3にフロログルシノール(4, phloroglucinol, benzene-1,3,5-triol)の構造が含まれていることを示した。この段階で、151.5 ppmと166.6 ppmの二つの炭素原子の未同定のままであった。構造の情報を得るために3のメチル化を行った。メタノール中でメチル化剤であるtrimethylsilyldiazomethaneを添加したところ、LC/MS分析において複数の生成物が観測された。そこで塩酸-メタノール中で3を110°Cで2時間加熱したところ5を得ることが出来た。5のESI-MS分析を行ったところ、正イオンモードで $m/z$  303、負イオンモードで $m/z$  301が観測された。3のLC/MS分析に比べて、5の値は14 mass unit増加しているため、メチル基が1つ導入されたことが示された(図10)。5を3と同様にDMSO-*d*<sub>6</sub> : TFA (9:1)中で<sup>1</sup>H NMR分析した結果、3で観測された6.43 ppmと6.63 ppmのピークに加え、新たにメチル基と思われるピークが3.88 ppmに観測された(図11)(表1)。<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMBC法で5を分析した結果、3.88 ppmから未同定の165.5 ppmへの相関が確認された(図12)。この結果から165.5 ppmの炭素はカルボキシル基であり、2は1のメチルエステル体であることが判明した。ここで5の<sup>1</sup>H NMRスペクトラムのピーク面積を求めたところ、フロログルシノール構造上の二つの水素それぞれとメチル基の面積比は1 : 3では

なく2:3であった。つまり、3および5の分子中には2つのフロログルシノール構造が対称に存在することを示すものであった。これらの結果に加えて、未同定のままである151.5 ppmの炭素の存在から、3の構造は2つのフロログルシノール基をカルボキシビニル構造(carboxyvinyl)で接続したものではないかと考えられた。2つのフロログルシノールを未同定の炭素で結合させ、さらにその炭素にカルボキシル基を結合させた。この段階で分子量は予想される分子量より18もしくは19 mass unit大きく、2が黄色色素であることを考えて、フロログルシノール間で脱水が起こり3環系のキササンチリウム(xanthylum)構造になっていると考えられた。これらの結果から3の構造は9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylumと推定され、分子量は289(M<sup>+</sup>)であると推定された。最終的に3の紫外・可視光吸収スペクトルは酸性条件では430 nmに極大値を示すが、3N NaOHを添加してアルカリ性にしたところ、深色域へと移行した(図13)。これはこれまでに報告されている、1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylumの特性と一致した。最終的に、高分解能ESI-MSを用いて、3および5の分子式をそれぞれ、C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub> (m/z 289.03450 (M<sup>+</sup>), δ 0.22 mmu) およびC<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub> (m/z 303.05201 (M<sup>+</sup>), δ 0.28 mmu) であることを確認した。この結果、2の化学構造は9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylum であることが判明した。本物質(3)はこれまでに報告されてい

ない新規の有機化合物であったことから、タマネギの学名*Allium cepa*にちなんでcepaic acidと命名された。黄色タマネギの乾燥外皮由来の黄色色素の構造決定として、cepaic acidは世界初めての報告となった。

### 3: Cepaic acid の生成過程の検証

#### A 研究目的

前章で報告したとおり、黄色タマネギの外皮から黄色色素として cepaic acid (3,9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylum) を LC/MS および HPLC を用いて単離することに成功し、NMR および化学修飾法によって構造決定を達成した。キササンチリウム (xanthylum) 構造は合成色素によく観られる構造であるが、天然からは、ブドウの抽出液を長期保存したときに生じる黄色色素がキササンチリウム構造であるとの報告例がある。今回単離された cepaic acid (3) の構造は、ワイン中におけるキササンチリウム色素生成の仮説に基づいて考えると、2分子のプロログルシノール (4, phloroglucinol) が、アルデヒド酸である glyoxylic acid (6) によって架橋され、その後脱水・酸化されることで形成されるのではないかと推定された。そこでプロログルシノールを基質としてグリオキシル酸を初めとする種々のアルデヒドを反応させ、色素形成を確認すると同時に、タマネギ皮中での色素生成過程の検証を行うことを目的とした。

#### B 研究方法

試薬：プロログルシノール二水和物 (和光純薬)、グリオキシル酸一水和物 (和光純薬)、アセトアルデヒド (和光純薬)、ホルムアルデヒド (和光純薬)、アスコルビン酸 (和光純薬)

色素形成反応：プロログルシノールを 50 mM の濃度で 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解させ、アルデヒドを 25 mM になるように添加し、48 時間攪拌した。還元状態での反応進行を確認するために、アスコルビン酸 (L-ascorbic acid) を 50 mM 加えた。

LC/MS 分析条件：

機器：Waters LC/MS system

LC: Waters 2695 alliance

MS: Quattro micro

PDA: Waters 2996

Column: nacalai tesque 社製 COSMOSIL

C<sub>18</sub>-MS-II (4.6 x 250 mm)

移動相: A 0.1% ギ酸入り H<sub>2</sub>O, B 0.1% ギ酸入りアセトニトリル

Gradient 条件: B 移動層 10%~100% for 30 min

PDA 検出範囲 (190 nm~600nm)

ESI-MS: 正イオンおよび負イオンモード、

Cone 電圧 = 10, 30, 60 V

#### C 研究結果

キササンチリウム構造は fluorescein や rhodamine、そして人工着色料の一つである erythrosine 等の人工色素中によく見られる構造である。しかしながら、天然からの試料中においてキササンチリウム構造が発見された例は、長期保存中のブドウ抽出液やワインに生成する黄色色素の例以外では殆ど知られていない。Moutounet らのフランスの研究グルー

ブは、ワイン中に生成されるキサランチリウム色素は、ワイン中に大量に含まれる (+)-カテキン(catechin)を原料として形成されると推定した。彼らの仮説によると、同じくワイン中に含まれる酒石酸から自動酸化によってグリオキシル酸が形成され、カテキンの8位の炭素のグリオキシル酸 (6) のアルデヒド基への求核反応によってカテキンが重合され、5位または7位の水酸基の間で脱水反応が起こり、さらに酸化反応をうけてキサランチリウム構造が形成される。実際、彼らはワインに似たモデル溶液中からカテキンの二量体から形成されたキサランチリウム化合物を単離し、NMR等を用いて構造決定に成功している。今回黄色タマネギ皮から単離された cepaic acid の構造は 1,3,6,8-tetrahydroxanthylum 構造を内包しており、ワイン中のキサランチリウム形成の仮説に従うと、二つのフロログルシノール (4) がグリオキシル酸 (6) によって架橋され、脱水および酸化反応を通して cepaic acid へと導かれると考えられた。そこでフロログルシノールとグリオキシル酸をリン酸緩衝液中で攪拌したところ、無色透明であった混合溶液は、48時間後には濃い褐色溶液へと変化した (図14)。この溶液をLC/MS分析した結果、cepaic acidの生成が明確に観測された (図15)。さらに450nmで分析したところ、タマネギ皮からの抽出液と同様に、cepaic acidのピーク後方には、広範なブロードピークを観測した。このブロードピークが褐色色素の主要成分であると思われた。フロログルシノール (4) とグリオキシル酸 (6) の混合溶液中におい

て、cepaic acidを含む黄色色素の生成に酸化条件が必要かどうかを確認するために、混合溶液内にアスコルビン酸を加え還元状態のまま攪拌した。その結果、溶液は無色透明のままであった (図16)。LC/MS分析の結果、グリオキシル酸 (6) によって架橋された二量体(分子量308)と考えられるイオンピークが  $m/z$  307に観測された。また三量体 (分子量490) に相当するイオンピーク  $m/z$  389をもつピークが観測された (図17)。さらに二量体から脱水して閉環した構造物(分子量290)に相当するイオンピーク  $m/z$  291をもつピークを4.92 minおよび9.25 minに観測した。前者は閉環する前の二量体構造のESI-MS分析中に生じた脱水ピークの可能性が高く後者は閉環した3環構造のものであると考えられた。さらに7.64 minには、三量体から水一分子だけが脱水して閉環した構造物(分子量472)に相当するイオンピーク  $m/z$  473を正イオンモードで観測した。これらの結果は、還元状態化において、グリオキシル酸 (6) によるフロログルシノール (4) の架橋および脱水反応までは進行していることが示唆され、閉環した構造からキサランチリウムへ「色素化」するためには酸化反応が必須であることが示された。

フロログルシノール (4) は強力な求核試薬であるため、グリオキシル酸 (6) のアルデヒド基への求核反応による架橋が容易に想像されるが、他のアルデヒド類ではキサランチリウムのような色素形成が進行するのか検証された。アルデヒドとしては最も一般的なアセトアルデヒドとホルムアルデヒドが選択された。アセ

トアルデヒドは特にワイン等のアルコール飲料中で発生し、カテキンを重合体化させることが知られている。カキにおける渋抜きとしてもエタノール由来のアセトアルデヒドが用いられるが、これも渋味の原因であるカテキンオリゴマーをアセトアルデヒドの架橋によって高重合化し不溶化させるためである。フロログルシノールとアセトアルデヒド、およびホルムアルデヒドを混合させて攪拌したところグリオキシル酸のときと違い、色素は形成されなかった(図18、19)。アセトアルデヒドとの反応液をLC/MSで分析した結果、5つの顕著なピークが観測され、これらの負イオンモードにおけるESI-MSスペクトラムは、 $m/z$  277, 429, 581, 734, 866を示し、アセトアルデヒドで架橋されたフロログルシノールの二量体、三量体、四量体、五量体、六量体に相当することが示された(図20、21)。ホルムアルデヒドではアセトアルデヒドのような顕著なピークは検出されなかった。この結果から、アセトアルデヒドの場合、フロログルシノール(4)の架橋までは容易に進行するが、その後の脱水反応へは進行しないことが推定された。これはキサンチリウム色素形成におけるアルデヒドとしてのグリオキシル酸(6)の特殊性を示すものであった。なぜグリオキシル酸(6)が架橋すると、フロログルシノール間で脱水一閉環反応が進行するのかとの疑問が生じるが、これは現時点ではグリオキシル酸(6)のカルボン酸とフロログルシノールの水酸基間で水素結合が生じ、二つのフロログルシノール間が自由回転せずに面を形成し、脱水しやすくな

るからではないかと考えている。これを明らかにするのが今後の課題である。

フロログルシノール(4)はクエルセチン(2)を穏和な条件で酸化した際に、A環から生じた2,4,6-trihydroxybenzoic acid (THBA)から容易に脱炭酸されることで生成することが報告されている。クエルセチンのB環由来の酸化産物であり3,4-dihydroxybenzoic acid (1)はタマネギ皮の抽出液にかなり高濃度で含まれていることがLC/MS分析からわかるが、A環に相当するTHBA およびフロログルシノールは観測されない。これは求核性の高いフロログルシノールがアルデヒド等と反応し、その一部はcepaic acid (3)のような色素へと形成されることを強く示唆するものであった。これらの結果および考察からタマネギの外皮における色素形成を次のように推定した(図22)。タマネギの再外殻鱗茎が乾燥してラミネート化するに従い、自動酸化によって鱗茎に含まれるクエルセチン(2)が分解し、A環はTHBAへと変化後、さらに脱炭酸してフロログルシノール(4)へと変わる。フロログルシノールにグリオキシル酸(6)が反応し、脱水閉環—さらなる酸化を通してキサンチリウム色素が形成される。この仮説はタマネギ鱗茎の褐変が、鱗茎の乾燥と完全に同調するという現象をよく説明している(図23)。グリオキシル酸(6)の供給源が何であるのか？そしてcepaic acid(3)以外の黄色色素も同様にキサンチリウム色素群であるのかという疑問に答えるのが今後の課題である。

#### 4: 濾紙電気泳動法を用いた褐色色素の判別法の検討

##### A 研究目的

タマネギ外皮から単離・構造決定された cepaic acid が正に耐電した構造をもつていたため、紫外可視光吸収スペクトルおよび逆相HPLCでは差異が認められなかった褐色間色素には電気的特性に差があるのではないかと示唆された。そこで濾紙電気泳動法による褐色色素間の差別化をはかることを目的とし、新しい分析系構築のための予備的検討を行った。

##### B 研究方法

###### 試料

- ・カカオ色素 (3種: 和光純薬製品、関東化学製品、三栄源 FFI 製品)
- ・カキ色素 (1種: 関東化学製品)
- ・コウリヤン色素 (1種: 三栄源 FFI 製品)
- ・タマリンド色素 (1種: 三栄源 FFI 製品)
- ・タマネギ色素 (1種: 三栄源 FFI 製品)

これら試料を 0.1mg/mL となるように MilliQ 水に溶解させて分析試料とした。またクエルセチンは 1mg/ml のメタノール溶液を用いた。

###### 機器

濾紙電気泳動装置: EPP165AA (ADVANTEC 社製)、泳動用安定電源: EPS203AA (20 ~ 2000 V, 5 ~ 200 mA) (ADVANTEC 社製)、濾紙: GLASS FIBER FILTER GB-140 (300 x 300 mm)  
実験方法: 短冊形に切った濾紙(長辺 300 mm)の中心にキャピラリーを用いてサン

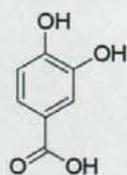
プルを添加した。その後、濾紙を泳動液 (Tris-HCl 緩衝液 pH7.5) にサンプルが流れないように注意深く浸し、電気泳動装置へと設置した。電気泳動のための電圧は 150V とし、30 分間泳動を行った。

##### C 研究結果・考察

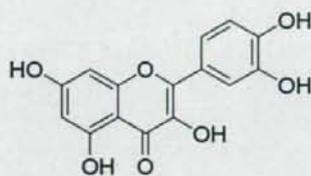
カカオ、カキ、コウリヤン、タマリンド、タマネギの 5 種 7 検体の水溶液を濾紙に津ポットし、泳動液として中性域の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を用いて電気泳動を行ったところ、全ての色素が陰極側へと移動した (図 24)。その移動距離は 15 mm であり、色素間に移動度の差は見られなかった。クエルセチンを同様の条件で電気泳動した場合、スポットは原点に留まったままであった (図 25)。

これらの結果は、試験に用いた褐色色素群は中性域において、正に帯電していることを示すものであった。泳動液については酸性条件も検討したが (0.1% ギ酸溶液 pH 2.8)、褐色色素は酸性条件下で迅速に沈殿を形成するので、展開液としては不適當であった。実際電気泳動を行うと、スポットは原点から移動しなかった。今回の予備的な検討で、褐色色素が正に帯電していることが強く示唆された。アントシアニンを除いたフラボノイド類 (カテキンやクエルセチン) は、電荷として中性であるので、この結果からも褐色色素の色素成分はフラボノイドそのものでないことが推測された。今回用いたグラスファイバー製の濾紙では

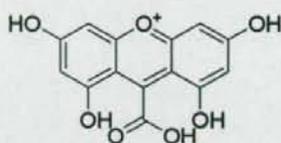
色素間の移動度に差違が見られなかった。  
これは色素のそれぞれがほぼ同じ化学構造  
をもつためなのか、条件設定によるものな  
のかはまだ判らない。移動度の一致が同種  
の化学構造のためであるとしたら、褐色色  
素の化学構造の解明に大きな前進が期待で  
きる。



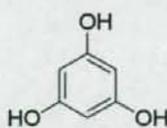
1



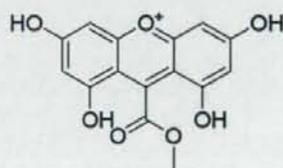
2



3



4



5



6