

200909053A

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 21 年度総括報告書 (2 年間のうち 2 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 22 年 5 月

目次

3	研究概要
5	研究目的
9	1) タマネギ外皮から黄色色素の抽出条件の検討
13	2) タマネギ外皮抽出液中の新規色素成分 (1、2、3) の LC/MS 分析
16	3) タマネギ外皮の未知色素成分 3 の単離精製と構造決定
24	図表

研究概要

総括および主任研究者：伊藤裕才

昨年度は褐色色素製品を LC/MS で分析し、黄色タマネギの乾燥外皮の抽出液からキサントリウム化合物である cepaic acid を単離・構造決定した。この発見は黄色タマネギの色素としては世界で初めての報告となり、タマネギ外皮の黄色色素がキサントリウム化合物の集合体であることを強く示唆するものであった。また cepaic acid の構造から cepaic acid がタマネギ鱗茎に多量に含まれるフラボノイドであるクエルセチンの酸化分解物から脱水酸化反応によって再構成されたものであることが示唆され、試験管内において cepaic acid の合成に成功した。

この結果をうけて、本年度はタマネギ外皮に含まれる色素のさらなる探索を行った。まず色素の抽出条件の詳細な検討を行った。検討の結果、水による抽出が最も効率が高かった。また、これまでの抽出過程においては、抽出時間が長ければ長いほど色素が濃くなり抽出の終了点が不明であった。今回の検討でタマネギ皮をろ過除去後の抽出液中で、時間の経過と共に新たに色素が生成していくことが示された。これは抽出液中に色素の前駆物質が多量に存在し、抽出後の酸化反応によって色素へ返還されていくことを示唆した。そこで、アスコルビン酸溶液を用いた還元下での抽出を行った結果、色素の抽出は約3時間で飽和に達し、外皮除去後における抽出液中での色素生成は観測されなかった。本結果によって、タマネギ外皮中の色素は酸化反応によって生成されていることが強く示唆された。

次に得られた抽出液を逆相の LC/MS を用いて分析した結果、cepaic acid 以外に3つの色素ピークを観測することができた。抽出は還元状態で行われたため、観測された色素は抽出後に生成したものではなくタマネギ外皮中に存在していたものと考えられた。Cepaic acid の可視領域における極大吸収波長は 430 nm であるが、これらの新たに観測された色素の吸収波長はそれよりも高波長側にシフトしており 450~480 nm であった。タマネギ外皮抽出液全体の極大吸収波長は 450 nm 付近であることから、今回観測されたピークのような様々な吸収波長をもつ色素の集合によって全体の色調が形成されることが確認された。吸収波長の差違は化学構造に由来するため、未知色素群の化学構造の決定を試みた。まず最も極性が低く、480nm に極大吸収をもつ未知色素3について、単離精製およびマススペクトルおよび二次元 NMR を用いての構造決定を行った。その結果、未知色素3の分子量は 361 と推定され、その化学構造は cepaic acid に2置換したものであることが示唆された。置換基に関しては、未知色素3が酸性条件下におけるアルコール混在での加熱によって容易にエステル化されることからカルボン酸基が考えられるが、最終的な構造決定にはいたらなかった。なお未知色素2の分子量は 333 と推定された。

本年度の研究結果から、黄色タマネギ外皮の抽出液中に観察された未知の黄色色素が

cepaic acid の類縁体であることが示され、黄色色素がタマネギ鱗茎に含まれるクエルセチンの酸化分解からアルデヒド類（グリオキシル酸）による求核反応、脱水縮合、さらなる反応によって生成したキササンチリウム化合物群であるという仮説を強く支持する結果が得られた。

学会発表（2件）

- Ito, Y., Yamazaki, T., Kawamura, Y.: The chemical structure of a yellow pigment from the dried outer scales of the yellow onion *Allium cepa*, 4th International Conference on Polyphenols and Health (Harrogate, 2009.12)
- 伊藤裕才, 山崎壮, 河村葉子: タマネギ外皮より単離された黄色色素の化学構造
日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京, 2010.3)

誌上発表（1件）

- Ito, Y., Sugimoto, N., Akiyama, T., Yamazaki, T., Tanamoto, K.: Cepaic acid, a novel yellow xanthylum pigment from the dried outer scales of the yellow onion *Allium cepa* *Tetrahedron Letters* 50, 4084-4086 (2009)

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」、「ペカンナッツ色素」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) コウリャン色素 (コウリャンの種子から得られた、アピゲニジン及び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：イネ科コウリャン (*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。主色素はアピゲニジン及び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ピゲニジン及び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 (通称コウリャン、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り中間的な色調が交わることがある。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。

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 (*Butyrospermum 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圧搾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) タマネギ外皮から黄色色素の抽出条件の検討

目的

これまでのタマネギ外皮からの色素の抽出は、経験的な判断のみで行われてきた。しかしながら、新たな色素の単離精製、物性解明、そして定量を行うにあたって、タマネギ外皮から出来るだけ効率良くかつ確実に色素を抽出する方法を確立する必要性があった。抽出溶媒に関しては、「既存添加物名簿収載品目リスト」に指定されている含水アルコールとしてメタノール水溶液を用い、色素抽出に最適なメタノール濃度を検討することを目的とした。抽出時間についても抽出が飽和に達する時間を検討することを目的とした。

第1節 抽出溶媒の検討

実験方法

タマネギ外皮はミルサーを用いて出来るだけ細かく粉砕した。抽出溶媒として濃度が 0、10、30、50、70、100%のメタノール水溶液を調整した。粉砕したタマネギ外皮 0.5 g に対し、各抽出溶媒 20 ml を加え、蓋をしたバイアル中でマグネティックスターラーを用いて 12 時間攪拌した。攪拌後、抽出液はシリンジフィルターによって濾過された。分光光度計を用いて得られた抽出液の紫外可視光吸収スペクトルの測定を行った。また逆相カラムを用いた LC/ESI-MS 分析を用いて成分分析を行った。LC/MS による DHBA と quercetin の検出には、それぞれの極大吸収波長である 295 nm および 370 nm を用い、またタマネギ外皮の黄色色

素である cepaic acid(分子量 289)に関しては ESI-MS の正イオンモードにおける m/z 289 を標的とした Selected Ion Recording 法 (SIR 法) を用いて検出した。クロマトグラフ全体の黄色色素の検出波長としては、抽出液の極大吸収である 450 nm を用いた。LC/MS 分析の条件は以下のとおりであった。

カラム : COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (Ø4.6 × 250 mm ナカライテスク (株))

溶離液 : (A) 0.1%ギ酸入り水

(B) 0.1%ギ酸入りアセトニトリル

流量 : 0.5 mL/min

グラジェント条件 : B 溶離液 10~70% for 30 min

吸光検出 : PDA (210 ~ 600nm)

ESI-MS 条件 : SCAN 測定 (ESI positive and negative ion mode, cone 電圧 : 10,30,60V, SIR 測定 (標的イオン : m/z 289, cone 電圧 : 30V))

結果および考察

タマネギ外皮を粉砕し、0%から 100%まで 6 段階に調整した含水メタノール溶液による抽出を行った。12 時間攪拌行い、得られた各抽出液中に含まれる成分を LC/MS を用いて分析した。得られた TIC (Total Ion chromatography) の結果から、保持時間 11 分および 22.5 分に顕著なピークを確認した (Figure 1)。各ピークの ESI-MS 分析の結果、前者のピークは陰イオンモードで m/z 153、後者のピークは正イオンモードで m/z 303 にイオン関連ピークを得た (Figure 2)。これらはタマネギ外皮からよく観察される 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBA) およびタマネギ鱗茎に含まれるフラボノール

である quercetin と考えられ、市販の標品を分析した結果、保持時間およびマススペクトルが一致したことから、それぞれ DHBA および quercetin であると確認された。両物質の紫外吸収スペクトルの極大吸収波長から、DHBA を 290 nm および quercetin を 370 nm で検出したクロマトグラフを作成し、各ピーク面積を用いて抽出液組成間の抽出効率を比べた(Figure 3 and 4)。その結果、DHBA の抽出効率は 10%メタノール溶液が最大であったが、0%から 70%メタノールまで殆ど抽出量は変わらず、100%メタノールで極端に抽出量が下がることが判明した(Figure 3)。また quercetin の抽出効率は 50%メタノール溶液で最大となり、0%メタノールや 100%メタノールでは抽出されにくいことが観察された(Figure 4)。黄色色素である cepaic acid の抽出については、量が少ないため ESI-MS による標的イオンを選択的に検出する分析法(SIR 法)によって検討を行った。その結果、cepaic acid は 0%メタノール(水)において最も抽出された(Figure 5)。cepaic acid の抽出量はメタノールの濃度が上がるにつれて減少し、100%メタノールでは殆ど抽出されなかった(Figure 5)。

色素全体の抽出量に関しては LC/MS では判別できなかったため、分光光度計による紫外可視光の吸収スペクトルで検討した。黄色色素の指標として 400~500 nm の吸収スペクトルを比べた結果、30%~50%メタノールにおいて最も黄色色素の抽出が観察されたが、0 および 10%濃度でも殆ど同量であり、70%および 100%とメタノール濃度が上昇するにつれ色素の抽出は減じた(Figure 6)。また紫外部(300~400 nm)の吸

収はメタノール濃度が増すにつれ増加した。

今回の検討の結果、改めてタマネギ外皮の黄色色素の水溶性が確認された。Cepaic acid は水によって最も抽出され、また吸収スペクトルによる分析においても、色素全体の抽出効率は 0%から 50%まで殆ど差違がみられなかった。一方でメタノール濃度が増すにつれ quercetin の抽出量は増加していった。これは quercetin の極性がやや低いことによるためである。また quercetin の酸化分解物と考えられる DHBA は、0%から 70%までほぼ同じ効率で抽出された。

これらの結果から、タマネギ外皮から色素を得るためには、色素の水溶性および quercetin を取り込まないという観点から、水による抽出が最も適していることが示された。

第 2 節 抽出時間の検討

実験方法

第 1 節の抽出溶媒の検討結果を踏まえて、色素成分の抽出溶媒には水を用いた。ミルサーを用いて粉碎タマネギ外皮 4.5g に対し、水 200ml を加えて攪拌し、攪拌開始から 30 min、1 h、2 h、3 h、12 h、および 16 h の各時点で溶液を 5 ml サンプリングし、シリンジフィルターを用いて濾過後、分光光度計を用いて吸光スペクトルを測定した。実験を進めていく中で、30 min 時点で回収した試料が時間経過と共に回収時よりも色が濃くなっていることが観測された。そこで、抽出液は酸化によりさらに色素生成が進行するのではないかという仮説を立て抽出の再検討を行った。同じ条件で、15 min、30 min、60 min、120 min、180 min の各時

間でサンプリングを行い、それぞれの吸収スペクトルを測定した。同時に 15 min 経過時点でサンプリングし濾過したサンプルについても攪拌開始から 30 min、60 min、120 min、180 min 後の吸収スペクトルを測定した。抽出後の酸化反応を阻害するために、抽出溶媒に酸化防止剤としてアスコルビン酸を加えた比較実験を行った。水 200 ml にアスコルビン酸 0,35 g を加え 10 mM とし、粉末タマネギ外皮 4,5g を加えて攪拌を開始した。上記同様に攪拌開始から 15 min、30 min、60 min、120 min、180 min、240 min でサンプリングし、それぞれの吸収スペクトルを測定した。15min 経過 時点でサンプリングし濾過したサンプルも、同じ様に時間ごとに吸収スペクトルを測定した。またアスコルビン酸水溶液で抽出したサンプル (4 時間後) は、LC/MS による分析も行った。LC/MS 分析の条件は第 1 節の抽出溶媒の条件の際と同じであった。

結果および考察

これまでタマネギ外皮から色素の抽出時間は感覚的に約 12 時間 (over night) という時間設定で行われていた。しかしながら、タマネギ外皮の残渣が無色透明になったことを判別することは難しく、一方で抽出液の色調は限りなく濃くなっていくようにみられた。そこで今回、色素の抽出の吸収スペクトルを経時変化で追跡し、色素抽出の飽和点を探ることにした。始めに抽出開始から 30 分後から 16 時間後までの数点をサンプリングし、吸収スペクトルを測定した。16 時間後のサンプルは 30 分後のサンプルより約 1.5 倍の色素量が確認されたが、飽和点には達しなかった (Figure 7)。この時、

非常に興味深い発見があった。抽出開始から 30 分後に測定し、その後 16 時間実験台上で放置していたサンプルの色調が、測定時よりもかなり濃くなり、16 時間後にサンプリングしたサンプルの色調と目視ではほぼ同じに見えた。放置していたサンプルにはタマネギ外皮は含まれていないので、抽出が進むことはない。そのため、抽出液中で色素生成が進行している可能性が示唆された。ここで新たに「タマネギ外皮の試料から抽出された成分の中には色素の前駆体が存在しており、抽出後の酸化反応等で色素へと変換される」という仮説が提唱された。そこで再度サンプリング時間を狭めて抽出実験を行い、最初 (15 分後) にサンプリングし測定した試料の吸光スペクトルも継続して測定し続けた。その結果、攪拌中の試料は 15 分後から 3 時間まで色素量は上昇し続けたが (Figure 8)、15 分後に採取した試料の色素量も、濾過でタマネギ外皮が取り除かれているにも関わらず、ほぼそれと同じ割合で色素量が増え続けていることが観察された (Figure 9)。この結果、抽出液中で新たに色素が生成されていることが判明した。

cepaic acid を phloroglucinol と glyoxylic acid から合成する過程において、反応液中にアスコルビン酸を添加して還元状態にしたところ、色素の形成が起らなかったことが報告されている。これは phloroglucinol の glyoxylic acid との間の求核反応によって生じた色素の前駆体が xanthylum 構造へとなるためには酸化反応が必要であることを示したものであった。この結果をうけて、もしタマネギ外皮の抽出液中に色素の前駆物質が存在してならば、抽出液中の酸

化反応を阻害することで抽出後の色素形成を抑えることができると考えた。そこで、アスコルビン酸を添加した水を抽出溶媒とし、タマネギ外皮の抽出作業を行った結果、15分後にサンプリングした試料は時間が経過してもそれ以上色づくことがなく、最初に測定した吸収スペクトルを維持した (Figure 10)。また還元条件で抽出を続けたところ、試料から抽出される色素量は3時間で飽和点に達した (Figure 11)。還元状態で抽出した試料を LC/MS で分析した結果、cepaic acid や後述する他の色素成分の存在を確認することができた (Figure 12)。

今回の結果から色素形成には「酸化反応」が必要であることが改めて示され、抽出液中には色素の前駆物質または原料が存在することが明らかになった。また還元状態下でも cepaic acid や他の色素成分が観測されたことから、これらの色素が抽出時に形成されたものではなく、タマネギ外皮中に色素として存在することが確認された。

2) タマネギ外皮抽出液中の新規色素成分 (1、2、3)のLC/MS分析

目的

タマネギ乾燥外皮からの抽出液の逆相クロマトグラム分析において、色素の大半は広範なブロードピークとして観測される。その中においてcepaic acidのピークは高極性側で観測されるが、前章で抽出方法を検討し、クロマトグラムを精査した結果、cepaic acidの近辺およびcepaic acidよりも低極性の位置に3つの新たな色素成分(1、2、3)が観測された。本章ではこれら色素成分の分光学的な性質および分子量について情報を得ることを目的とした。

実験方法

a) 分析試料の作成

前章で検討した結果をうけて抽出溶媒には水を用いた。タマネギ外皮4.5gをミルサーを用いて粉末にし、水200mLを加えて15分間攪拌した後、上清を回収し0.45 μ mフィルターでろ過したものを試料としてLC/MSで分析した。LC/MSの条件は下記の通りである。

b) LC/MS分析条件

カラム：COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (Ø4.6×250mm ナカライテスク(株))

溶離液：(A) 0.1%ギ酸入り水

(B) 0.1%ギ酸入りアセトニトリル

流量：0.5mL/min

グラジェント条件：B 溶離液 10~70% for 30 min

吸光検出：PDA (210~600nm)

ESI-MS条件：ESI positive and negative

ion mode、SCAN測定、Cone電圧=10、30、60V

c) タマネギ外皮の作成と抽出物の分析

試料として研究所近辺の八百屋で北海道産タマネギを購入した。既存の乾燥外皮を除去して鱗茎を露出させ、そのまま研究室内で室温のまま放置した。最外殻の鱗茎は橙色へと色づきながら乾燥してラミネート化し、約2ヶ月後には完全に乾燥した外皮を形成した。この外皮を試料とし上記と同様の条件で粉碎・抽出しLC/MS分析用の試料とした。

結果および考察

タマネギ外皮水抽出液を逆相LC/MSで分析した結果、cepaic acid(10.18 min)以外の色素ピークとしてcepaic acidよりも高極性側にピーク1(9.83 min)、低極性側にピーク2(18.82 min)およびピーク3(19.25 min)を観測した(Figure 12)。

ピーク1について、PDAによる紫外可視吸光スペクトルでは、421nmに極大吸収を示した(Figure 13)。正イオンモードにおけるESI-MSスペクトル分析の結果、 m/z 361に分子関連イオンピークを得た(Figure 14)。また負イオンモードで分析した結果、 m/z 359に分子関連イオンピークを得た(Figure 14)。ピーク2については、紫外可視吸光スペクトルにおいて442nmに極大吸収を示した(Figure 13)。正イオンモードにおけるESI-MSスペクトル分析の結果、 m/z 333に分子関連イオンピークを得た(Figure 15)。また負イオンモードで分析した結果、 m/z 331に分子関連イオンピークを得た(Figure 15)。ピーク3については、PDAによる紫

外可視吸光スペクトルでは、485 nm に極大吸収を示した(Figure 13)。正イオンモードにおける ESI-MS スペクトル分析の結果、 m/z 361 に分子関連イオンピークを得た(Figure 16)。また負イオンモードで分析した結果、 m/z 359 に分子関連イオンピークを得た(Figure 16)。

Cepaic acid の紫外可視吸光スペクトルにおける極大吸収が 430 nm であるのに対し(Figure 13)、新しく観測されたピークは明らかに違う吸収波長を示した。特に 3 について吸収波長は 480 nm とかなり高波長側へシフトしており、タマネギ色素の赤味に貢献する色素であることが示唆された。

Cepaic acid の ESI-MS 分析の結果、正イオンモードで m/z 289 に、および負イオンモードで m/z 287 に観測され(Figure 17)、構造決定の結果、cepaic acid の中心構造は正に耐電した xanthylum 構造であり、分子量は 289+ と報告されている。今回の分析で確認されたピーク 1、2 および 3 も、cepaic acid と同様にクエルセチンの酸化によって生じた xanthylum 化合物であると推定すると、ESI-MS 分析から得られた結果からそれぞれの分子量は 361、333、361 であることが推定された。また得られた各ピークのマススペクトルには上記の親イオン以外に特徴的なフラグメントピークが観測された。

これまでの分析で用いられたタマネギの乾燥外皮は、三栄源(株)より分譲をうけたものであったが、この試料にはタマネギの皮以外のゴミも若干散見された。そこで、抽出液中に観測された色素ピークがコンタミネーションによるものでないことを確認するために、黄色タマネギを市場で購入し、

乾燥外皮を取り除き、最外殻の鱗茎を自分の手で乾燥させて外皮を形成させた。鱗茎は株の頂点から乾燥してラミネート化し、色素の形成も同時に進行した。このようにして得られた自作の外皮を粉碎し、同様の条件で分析した結果、cepaic acid およびピーク 1、2、3 を確認することができた(Figure 18)。よって、これらの色素ピークはタマネギの鱗茎が乾燥することによって生じるタマネギ外皮に特有の色素であることが確認された。

タマネギ外皮の抽出液はおよそ 450nm 付近に極大吸収波長を持つ。これまでに単離・構造決定されている色素 cepaic acid は 1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylum 構造を中心に持ち、そのため 430 nm 付近に極大吸収を持つが、cepaic acid は quercetin の酸化によって生成されると考えられており、他の未同定の色素群も同様の生成過程を経た xanthylum 化合物ではないかと推測されている。タマネギ外皮抽出液の極大吸収波長は 450 nm 付近であるが、これは cepaic acid の吸収だけでは説明できない。今回、LC/MS で精査した結果、cepaic acid 以外に色素ピークとして 1、2、3 を発見した。これらの極大吸収波長は cepaic acid のものと違い、1 は cepaic acid よりさらに低波長側の 420 nm に、2 は 440 nm 付近に、3 に関しては大きく高波長側にずれて 480 nm と実に多様であった。この結果は、タマネギ外皮の色が、様々な吸収波長をもつ複数の化合物の集合からなっていることを強く示唆するものであった。また 1、2、3 の吸収スペクトルの形状はどれも cepaic acid のものと似ており、これらの物質も cepaic acid 同様に xanthylum 化合物であ

ることを示唆するものであった。

ESI-MS 分析から得られた分子関連イオンピークの情報から、1 および 3 は分子量 361、また 2 に関しては 333 と、cepaic acid 同様に低分子の色素であることが示された。吸収スペクトルの相似から、新しく発見された色素は cepaic acid に官能基が置換した類縁体もしくは誘導体であることが示唆された。分子量 361 と推定された 1 および 3 と cepaic acid の分子量の差は 72、2 と cepaic acid との差は 44、また 1 および 3 と 2 の差は 28 である。一般的に、分子量差 44 はカルボン酸基 (COOH) による置換、また分子量差 28 は 2 つのメチレン基 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$) もしくはアルデヒド基 (CHO) による置換に相当する。分子量差 72 はこの 2 つの合計である。

残念ながら置換された xanthylum が、どのような吸収波長を示すのかについての情報を得ることができなかった。新しく発見された色素ピークの中で、特にピーク 3 が cepaic acid とは大きく異なる吸収波長を示した。またピーク 3 はピーク 1 と同じ分子量であることが推定されたが、3 が 480 nm に極大吸収を示したのに、1 の極大吸収波長は cepaic acid よりも低波長の 420 nm であった。さらにピーク 1 は cepaic acid よりも高極性側に溶出されるのに対して 3 は cepaic acid よりもより極性の低い位置に溶出された。これらの事実は、タマネギ外皮中の色素は、平面構造的には大きく差がなくとも、吸収波長、極性に大きな差をもつ物質の集合体であることが示唆された。タマネギ外皮の抽出液を逆相クロマトグラムで分析した際、色素が高極性から中極性までの幅広い領域でブロードとして観測さ

れる理由は、このことに由来するのかもしれない。

上記の仮説を証明するためには、ピークを単離し、構造決定しなくてはならない。次章において、ピーク 3 の単離および構造決定について述べる。

3) タマネギ外皮の未知色素成分 3 の単離精製と構造決定

目的

タマネギ外皮の抽出液中に観察された色素ピーク 3 は、極大吸収波長が 480 nm に観測され mESI-MS 分析から分子量は 361 と推定された。これは cepaic acid (極大吸収波長 430 nm、分子量 289) と大きく異なっていた。そこで、本章においては色素成分 3 の構造決定を目的とし、タマネギ外皮の抽出液から 3 を精製するスキームの確立と、単離精製された 3 の NMR 分析を行った。

第 1 節 色素成分 3 の単離精製

実験方法

a) 単離精製スキーム

タマネギ外皮 34.32g をミルサーで粉碎し、水 1.5 L を加え、アルミホイルで蓋をしたビーカー中で、マグネティックスターラーを用いて 3 時間攪拌した。抽出液中のタマネギ外皮は、濾紙を用いたブフナー漏斗による吸引ろ過によって除去された。得られた抽出液を 2L の分液ロートに入れ、*n*-ブタノールを加え二層分配を行った。夾雑物をブタノール層に集め、色素のとどまった水層を回収した。この操作をもう 1 度繰り返し、回収した水層に 6N HCl (3mL) を加えて酸性にした後、再び *n*-ブタノールを加えて二層分配を行った。その結果、色素はブタノール層へと移行したため、水層を捨てブタノール層を回収した。回収したブタノール相を減圧下で濃縮し乾固した。色素成分を確認するために、逆相カラムを

用いた LC/MS 分析を行った。LC/MS 分析条件は以下の通りであった。

カラム : Cosmosil C₁₈-MS-II (Ø4.6 × 250 mm、ナカライテスク社製)

移動層 : A) 0.1%ギ酸入り水、

B) 0.1%ギ酸入りアセトニトリル

流量 : 1.0 mL/min

グラジエント条件 : B 移動層を 30 分間で 10%から 70%まで上昇させた。

紫外検出器 : Photo diode array (PDA) による (検出範囲 190-600 nm)

ESI-MS 検出 : 正および負イオンモード、cone 電圧 10,30,60V

得られたブタノール画分を減圧乾固後、Sephadex G-25 樹脂を充填したカラムによるゲルろ過を行った。G-25 樹脂は使用前に水中で 3 時間膨潤させた後、ガラスカラム (Ø40 × 400 mm) へ充填された。乾固した色素を 3%NaHCO₃ 溶液 20 mL に溶解させ、カラム上部へと負荷した。水を移動層として色素の挙動を観察した結果、色素は移動層の先端に溶出されるバンド (バンド 1) と遅れて溶出するバンド (バンド 2) とに分けられたので、それぞれのバンドをフラスコに集めた。集められた色素を上記の条件を用いて LC/MS で分析した。ピーク 3 はバンド 2 に含まれることが確認されたので、バンド 2 に 6N HCl を加えて酸性にし、*n*-ブタノールとの二層分配を行った。全ての色素はブタノール層へと移行したので、ブタノール層を減圧濃縮し乾固した。分液ロートからナス型フラスコへ試料を移す際に、メタノールによる洗い込みを丹念に行った。減圧乾固した試料をメタノール

に溶解し、再び上記の条件で LC/MS 分析を行った。その結果、3のピークは減少し、新たにピーク5が23.22分に出現した。ピーク5はピーク3の誘導体である可能性が考えられたので、HPLCによるピーク5の分取を行った。分取HPLCの条件は以下の通りであった。

機器：島津 HPLC システム (10A-vp)

カラム：Cosmosil C₁₈-MS-II (Ø20×250 mm、ナカライテスク社製)

移動層：A) 0.05%TFA 入り水

B) 0.05%TFA 入りアセトニトリル

流量：7.0mL/min

グラジェント条件：B 移動層を 20 分間で 30%から 70%まで上昇させた。

検出：PDA (450nm)

分取：手動

ピーク5は手動でフラスコに集められた。得られたピーク画分中の有機溶媒 (アセトニトリル) を減圧下で除去後、*n*-ブタノールを加えて二層分配を行い、*n*-ブタノール層に移行した色素を減圧濃縮して分析試料とした。

結果及び考察

タマネギ外皮をミルサーで粉碎し水を用いて抽出した。抽出残渣は濾紙とブフナー漏斗を用いて取り除いた。得られた粗抽出液中 (Figure 19) には、DHBA や quercetin といった夾雑物が多く含まれているが、タマネギ外皮の色素は中性域では高い親水性を示し有機溶媒には不溶であるため、*n*-ブタノールとの二層分配によってこれら夾雑物を出来る限り取り除いた。次に水層に溶け

ている親水性の高い夾雑物を取り除くために、色素の有機溶媒層へ抽出を試みた。タマネギ外皮の色素が酸性域では水に対して不溶性となり沈殿するという性質を利用し、水層画分を6N HClを用いて酸性にし、ブタノールと二層分配した結果、殆どの色素はブタノール層へと引き上げられた (Figure 20)。

この理由として、既報の cepaic acid を例に考えると、cepaic acid は分子中にカルボン酸を持ち、中性域では COO⁻のマイナスイオンの状態で存在し親水性を示す。しかしながら、塩酸を加えることでプロトン (H⁺) 濃度が増加し、COO⁻から COOH へとプロトン化されイオンの状態ではなくなるため、水相に留まらず有機相へと移動する。タマネギ外皮の色素の大半がこの方法でブタノール層へと移行されることから、未知の黄色色素群にも、構造の一部に cepaic acid のようなカルボン酸基が存在することが示唆された。

得られたブタノール画分を減圧乾固し (Figure 21)、メタノールに溶解して逆相 LC/MS で分析した結果、ピーク3が確認された。興味深いことに、低極性の部分に色素ピーク4が新たに観測された (Figure 22)。4の吸収波長は3と酷似していたため (Figure 23)、4は3の誘導体と推定された。詳細については後述する。

次に低分子画分の色素を集めるために、ゲルろ過による分画作業を行った。減圧乾固した色素試料を NaHCO₃ 溶液 (pH 9.8) に溶解し、水で膨潤させた Sephadex G-25 樹脂を充填したカラムに付加した。水で溶出した結果、色素は移動層の先端にでてくるバンド (バンド1) と、遅れて溶出されるバンド (バンド2) の2つに別れた (Figure

24)。両方の画分を集め LC/MS で分析したところ、目標とするピーク 3 や cepaic acid のような低分子の色素はバンド 2 に確認された (Figure 24)。このことから G-25 の操作によって色素はバンド 1 の高分子とバンド 2 の低分子に分画されたことが強く示唆された。しかしながら、タマネギ色素のようなポリフェノールの重合体分子が、きちんと分子ふるい効果によって分画されるのかどうかは、何らかのポリフェノールの標品を用いて確認する必要がある。なぜなら G-25 を用いるゲルろ過操作は主にタンパク質を対象にしたものだからである。

低分子色素が含まれるバンド 2 画分に 6N HCl を加えて酸性条件にした後、ブタノールを加えて二層分配を行い、色素をブタノール層へ集めた。ブタノール画分を減圧濃縮し、メタノールに溶解後、LC/MS でピークの確認を行ったところ、興味深いことに 3 のピークは減少し、新たにピーク 5 が出現した (Figure 25)。ピーク 5 の紫外可視光の吸収スペクトルは 480 nm に極大吸収を示したことから、精製作業中に 3 が変化したものであると考えられた。そこで口径の大きい C₁₈ カラムを用いて手動でピーク 5 の分取を行った。上でも述べたように、タマネギ色素はプロトネーションがかかった状態では、有機溶媒に可溶となるが、逆に水溶液には溶けにくくなる。逆相 HPLC による精製では、TFA を加えた水とアセトニトリルの混合溶媒を使用するが、濃い濃度の試料を注入すると、色素は水・アセトニトリル混合液中で不溶体となって析出してしまい、HPLC のラインフィルタやカラムを目詰まりさせてしまった。このため分取作業には非常に手間と時間がかか

った。得られたピーク 5 の画分は集められ、減圧濃縮でアセトニトリルを除去後に *n*-ブタノールを加えて二層分配し、色素を有機層へと引き上げた。その後減圧乾固してピーク 5 の精製画分とした。

得られたピーク 5 の精製画分の精製度を確認するために、LC/MS で分析した結果、ピーク 5 だけでなく、もともと単離の目標としていたピーク 3 および低極性に観測されるピーク 4 の存在が確認された (Figure 26)。さらに cepaic acid も確認された。これらのピークの保持時間はそれぞれ大きく異なるので、ピーク 5 の分取作業によって混入したものは考えられない。またピーク 4 および 5 の吸収スペクトルは、どちらもピーク 3 とほぼ同じであったことから、ピーク 4 および 5 はタマネギ外皮に含まれる天然物であるピーク 3 から派生した何らかの誘導体であると考えられた。これらの物質の性状については次節で詳しく述べる。

第 2 節 色素成分 3 およびそのエステル誘導体 (4 および 5) の分子量と相互変換について

実験方法

前節で精製された色素成分 5 の LC/ESI-MS 分析を行い、観測された各色素ピークの ESI-MS スペクトルを測定した。分析条件は第 1 節と同じであった。

色素成分 3 および 5 を色素成分 4 のメチルエステル体にまとめるために、まず 5 の精製画分のメタノール溶液の一部をスリ付き試験管に取り、減圧乾固後に、以下のような溶液 (1 ml) を加えて以下のような条件で反応を行った。1) 6N HCl、90°C、2

時間（湯浴）、2）塩酸メタノール、90℃、1時間（湯浴）、3）塩酸メタノール、50℃、15分（湯浴）、4）塩酸メタノール、常温、12時間。反応後のサンプルはそのまま LC/MS に注入して分析を行った。分析条件は第1節と同じであった。

結果および考察

前節で新たに確認された色素成分4および5の LC/ESI-MS 分析を行った結果、4においては正イオンモードで m/z 375、負イオンモードで m/z 373 のイオンピークが確認された (Figure 27)。また5においては正イオンモードで m/z 417、負イオンモードで m/z 415 にイオンピークが確認された (Figure 28)。cepaic acid が正に帯電した xanthylum を分子構造に持っていたことから、3、4および5も正に帯電していると過程して、前章で述べたとおり、3の分子量は361、そして4および5の分子量はそれぞれ375および417であると推定された。

HPLC 上のリテンションタイムの違いから考えて、4および5が3を分取する際に混入した夾雑物とは考えられない。上記で推定された分子量の差は、3と4の差が14、そして3と5の差が56であった。これらの差は一般的にメチル基およびブチル基の分子量に相当する。前節の5の精製過程において、HPLC での精製後にブタノールを加えて二層分配を行い、メタノールを加えて洗い込みの操作を行った後に減圧濃縮を行った。HPLC に用いた溶媒には酸性条件に保つために TFA が添加されており、ブタノールには水が一定の割合で溶解するため、ブタノールと水との間で二層分配を行った

際に、TFA がブタノール層へ混入した可能性が考えられた。酸性条件下でのカルボン酸とアルコールの濃縮においては、エステル形成が起こる可能性がある。これらのことを考えると、4および5は3のメチルエステルおよびブチルエステルである可能性が強く示唆された。

このように複数の類縁体が混在する状態では NMR による構造決定は行えない。再度 HPLC による分取精製を行う前に、加水分解もしくはエステル交換法によってエステル化された色素成分を単一の色素成分に集約させる方法を試みた。まず6N HCl を用いて加水分解を行った結果、驚いたことに全ての色素が cepaic acid へと変化した (Figure 29)。この結果は3が cepaic acid の類縁体であり、何らかの官能基が置換されていることを強く示唆するものであった。次に塩酸メタノール溶液を用いて、エステル交換反応によるメチルエステル化を検討した。90℃での反応を行うと、5の生成だけでなく加水分解による cepaic acid の生成も観察された (Figure 29)。条件検討の結果、50℃で30分加熱、もしくは常温で12時間放置といった穏やかな条件で反応させた場合、cepaic acid への分解が抑えられ、メチルエステル体 (5) へと集約されることが確認された (Figure 29)。

上記の結果から、3が cepaic acid の類縁体であり、置換基が加水分解で脱離すること、また分子内のカルボン酸は容易にエステル化することが判明した。cepaic acid にはカルボン酸が含まれているが、以前の cepaic acid に関する構造研究では、このカルボン酸をメチル化するには塩酸メタノール中において100℃で長時間加熱する必要

があった。そのため、今回観察されたように、酸との濃縮程度でエステル化されるカルボン酸基は cepaic acid 内のカルボン酸でないと推定された。3 と cepaic acid の分子量の差は 72 であることから、カルボン酸基が cepaic acid に置換している可能性は十分に考えられる。

第 3 節：色素成分 3 のメチルエステル体 (5) の NMR 分析

実験方法

第 2 節において、色素成分 3 および 3 のブチルエステル体 (4) を塩酸メタノール溶液中でのエステル交換反応によって 3 のメチルエステル体 (5) へと導いた。窒素ガスの吹きつけによって塩酸メタノールを除去後、重メタノール (CD₃OD) に溶解させ、NMR チューブ (Ø5 mm) に詰め、¹H NMR (500MHz) の測定を行った。参考試料として cepaic acid の重メタノール中における ¹H NMR 測定も行った。続いて、試料をサンプルチューブより取り出し、窒素ガスによって重メタノールを除去後、DMSO-*d*₆:TFA(9:1) 溶媒に溶解させて ¹H, ¹³C, ¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹³C HMBC スペクトルの測定(800MHz)を行った。

結果と考察

色素成分 3 のメチルエステル体を重メタノールを溶媒として ¹H NMR スペクトルの測定を行った。その結果、試料には幾らかの夾雑物が観測されたが、色素由来のシグナルとして 5.79 ppm, 6.11 ppm にシングレットのピークが観測された (Figure 30)。

また 6.34 ppm, 6.48 ppm, 6.68 ppm にも小さなピークが観測された。5 はメチルエステル体なのでメチル基に相当するシングレットピークを探した結果、3.80 ppm および 3.86 ppm にシングレットのピークを観測したが、5.79 および 6.11 ppm に対して 3 倍のピーク面積をもつてはいなかった。前節において酸性条件下において 3 は cepaic acid へ分解することが判明しており、塩酸メタノールによるメチルエステル化した試料の LC/MS 分析において、試料中に少量の cepaic acid の存在が確認されている (Figure 29)。これまで cepaic acid の NMR スペクトルは全て DMSO-*d*₆:TFA(9:1) 中で測定されているため、今回 cepaic acid の ¹H NMR スペクトルを重メタノール中で測定した。その結果、cepaic acid の 2 つの水素シグナルとして、6.48 ppm および 6.68 ppm にピークが観測された (Figure 31)。それゆえ、5 の ¹H NMR スペクトル中で観測された 6.48 ppm および 6.68 ppm のシグナルは cepaic acid 由来のものであることが判明した。次に試料を NMR チューブから取り出し、溶媒を除去した後に、DMSO-*d*₆:TFA 溶媒に溶解させて 800MHz の NMR でスペクトルを測定した。残念ながら試料を取り扱う際に夾雑物が混入した関係で、明確な ¹H NMR スペクトルを得ることが出来なかったが、色素と考えられる特徴的なピークとして 5.80 ppm および 6.34 ppm にピークを観測した (Figure 32)。またメチル基に相当する明確なピークは CD₃OD 中の分析同様に確認されなかった。¹³C NMR の測定も行ったが、48 時間積算しても十分な分解能のスペクトルを得られなかった。そこで ¹H-¹³C HMQC の測定を行った (Figure 33)。