

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安心・安全確保推進研究事業

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  
(H20-食品-若手-022)

平成 20-21 年度 総合報告書

研究代表者 伊藤裕才  
国立医薬品食品衛生研究所

平成 22 年(2010 年)5 月

## 目次

3	研究概要
5	研究発表
6	研究目的
10	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
12	2. 黄色タマネギ乾燥外皮からの黄色色素の単離・構造決定
12	2-1: 黄色タマネギ乾燥外皮の抽出液の LC/MS 分析
13	2-2: 新規黄色色素 <i>cepaic acid</i> の単離と構造決定
16	2-3: 色素ピーク D の単離精製
17	2-4: 色素ピーク D のエステル誘導体について
19	2-5: 色素ピーク D のメチルエステル体の NMR 分析
21	3. タマネギ乾燥外皮中における黄色色素の生成過程の検討
24	4. 濾紙電気泳動法を用いた褐色色素の判別法の検討
26	図表

## 研究概要

総括および主任研究者：伊藤裕才

化学構造が未解明のまま使用が続けられている褐色を呈するフラボノイド色素の色素本体の化学構造の解明を目的に研究を行った。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黄色タマネギを試料として、その乾燥外皮に含まれる黄色色素の単離精製と構造決定を行った。乾燥外皮を水または 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った結果、色素の大半は大きなブロードピークとして観測されたが、極性の高い位置に特徴的な色素ピークを確認した。この物質を溶媒分画とオープンクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて単離精製し、マススペクトルおよび二次元 NMR、化学修飾法をもちいて構造決定した結果、分子量 289 の 9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxanthylum であることが判明した。本色素はこれまでに報告されていない有機化合物であったため、タマネギの学名 *Allium cepa* にちなんで *cepaic acid* と命名された。さらに抽出液中に観察された *cepaic acid* 以外の 3 つの色素ピークについても分析を行った。*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。未知色素のうち 2 つについてはマススペクトル分析から分子量が 333 および 361 と推定され、後者については単離精製を試み、NMR 分析の結果 *cepaic acid* に置換基が結合した類縁体であることが判明した。

得られた *cepaic acid* の化学構造から、本色素は 2 分子のプロログルシノールがアルデヒドであるグリオキシル酸によって架橋され、続く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* を含む褐色色素の形成が確認された。タマネギの鱗茎にはフラボノールであるクエルセチン配糖体が多量に含まれているが、プロログルシノールはクエルセチンの自然酸化による分解物であることから、鱗茎の乾燥時（外皮形成時）にクエルセチンから形成されることが示唆された。プロログルシノールは強力な求核物質であり、グリオキシル酸のようなアルデヒド類と反応して重合される。グリオキシル酸以外のアルデヒドとして、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たところ、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ト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。色素形成に酸化反応が必須であることは、プロログルシノールとグリオキシル酸の混合液において、アスコルビン酸存在下の還元状態では色素の形成が行われなかったこと、およびタマネギ乾燥

外皮の水抽出液の色素量が時間とともに増加し、これはアスコルビン酸溶液を用いた抽出によって完全に抑制されることから強く示唆された。

最後にタマネギ皮から単離された *cepaic acid* がキサンチリウム構造をもち正の電荷を帯びていたことから、他の褐色色素もフラボノイドの酸化から生じたキサンチリウム化合物ではないかと仮定し、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検討した。その結果、上で述べた5つの褐色色素製品は全て陰極側へと移動した。しかしながら、その移動度に大きな差異はみられなかった。この結果は褐色色素が正に帯電していることを強く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と考えられた。

・研究発表

学会発表（3件）

- ・ 伊藤裕才・山崎壮・伊藤澄夫・棚元憲一：「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」第14回日本食品化学学会学術大会（武庫川，2008, 5）
- ・ Ito, Y., Yamazaki, T., Kawamura, Y.: The chemical structure of a yellow pigment from the dried outer scales of the yellow onion *Allium cepa*, 4<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols and Health (英国 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)

- ・ 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） なし

## 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」、「クロー色素」、「コウリャン色素」、「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、プロプ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ピ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こり中間的の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(*Butyrosprum 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ですが、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

### 目的

褐色系フラボノイド色素のうち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。

### 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 F F I 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 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

### 結果と考察

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かか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・製法によっ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<sub>18</sub>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

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, protocatechuic acid) 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 22.17 min 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 による成分分析では、色素成分は幅広い極性範囲でブロードなピーク形状を示し、色素が複雑な高分子であると推定された。しかしながら、これら色素の起源植物がタマネギからカカオまでと広範でありながら、色素の性状に差違を見つけるのが難しいという事実は、

逆にこれら色素は非常に類似した性質をもつ化合物ではないかと示唆された。

## 2: 黄色タマネギ乾燥外皮からの黄色色素の単離・構造決定

### 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) であると一般的に言われているが、酸性から中性条件において2は可視光域に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であるはずがない。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。

### 2-1. 黄色タマネギ乾燥外皮の抽出液のLC/MS分析

#### 方法

試料：黄色タマネギの乾燥外皮(20 g)

抽出方法：タマネギの乾燥外皮をフードプロセッサー（もしくはミルサー）を用いてできるだけ細かく粉碎後、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。この抽出液を0.2 μmのシリンジフィルターでろ過し、

以下のような条件でLC/ESI-MS分析へと供した。

#### LC/ESI-MS 分析条件

- 機器：Waters LC/MS system  
LC: Waters 2695 alliance  
MS: Quattro micro  
PDA: Waters 2996
- Column: COSMOSIL C<sub>18</sub>-MS-II(4.6 x 250 mm, nacalai tesque社製)
- 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

#### 結果および考察

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。

黄色色素を検出するために450 nmで検出した結果、色素成分の大半は広範囲にわたるブロードピークを確認された(Fig.4)。しかしながら、その中に特徴的な色素ピークが幾つか観測された(Fig. 4)。極性の高い

域に、430 nm に極大吸収を示すピーク A が観測された。その他、さらに高極性側にピーク B、低極性側にピーク C およびピーク D を観測された。ピーク B は 421 nm、ピーク C は 442 nm そしてピーク D は 485 nm に極大吸収に示した (Fig. 5)。抽出液全体の吸収は 450 nm であることから、観測されたこれらピークのように様々な吸収波長をもつ色素が集合してタマネギ外皮の色調を形成していることが考えられた。

色素ピーク A の LC/ESI-MS 分析の結果、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 (Fig. 6-a)。ピーク B については正イオンモードで  $m/z$  361 に負イオンモードで  $m/z$  359 に分子関連イオンピークを得た (Fig. 6-b)。ピーク C については、正イオンモードで  $m/z$  333、負イオンモードで  $m/z$  331 に分子関連イオンピークを得た (Fig. 6-c)。ピーク D については、正イオンモードで  $m/z$  361 に負イオンモードで  $m/z$  359 に分子関連イオンピークを得た (Fig. 6-d)。これらの結果から観測された色素ピークの分子量は比較的 low 分子であることが考えられた。

これまでの分析で用いられたタマネギの乾燥外皮は、市場から大量に分譲をうけたものであったが、この中にはタマネギの皮以外のゴミも若干ではあるが散見された。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、タマネギ乾燥外皮を自作することにした。市場で購入した黄色タマネギの乾燥外皮を取り除き、風通しのよい場所で数週間放置することで最外殻の鱗茎を乾燥させ外皮を形成させた。鱗茎はタマネギ株の頂点から乾燥が進行し、色素

形成も同時に進行することが観測された。このようにして得られた乾燥外皮を粉碎し、同様の条件で抽出し LC/MS 分析した結果、ピーク A およびピーク B、C、D を確認することができた。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。

ESI-MS 分析の結果、ピーク A が最も分子量が小さいことが予想され、本色素が乾燥外皮中の色素群の最小ユニットであることが示唆された。そこで本色素を単離し、構造決定することにした。

## 2-2. 新規黄色色素 *cepaic acid* の単離と構造決定

### 方法

単離精製：タマネギ乾燥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。その結果、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 ( $\text{pH} < 1$ ) 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 クロマトグラフィーに負荷した。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、ピークAを分取した。得られたピーク画分を凍結乾燥した結果、cepaic acid (3) 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: COSMOSIL C<sub>18</sub>-MS-II(20 x 250 mm, nacalai tesque社製)
- ・ 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
- ・ UV検出：450 nm
- ・ Gradient条件：B移動層10%~35% for 15 min

試料は手動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動で分取した。

#### 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°Cで測定した。

#### 結果および考察

まず抽出液中のエタノールを減圧下で除去し、得られた水溶液に*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に留まった。続い

て水層に塩酸を加えて酸性(pH<1)とし、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。この結果は、色素がカルボン酸のように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*n*-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すにつれ色素が溶出されていった。LC/MS分析を用いてピークAが溶出された画分を確認したところ、ピークAは10%メタノール画分に多く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を用いてピークAを精製した。得られた画分を凍結乾燥に付したところ、色素成分(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 (500 MHz) 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(Fig. 7, Table 1)。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。3の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは8つのピークを示した(Fig. 8, Table 1)。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。

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -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 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -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(Fig. 11)。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(Fig. 11)。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の二つの炭素原子が未同定のままであった。

構造決定のため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trimethylsilyldiazomethaneを添加したところ、複数の生成物がLC/MS分析において観測された。次に塩酸/メタノール中で3を110°Cで2時間加熱した結果、生成物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(Fig. 9)。3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。生成物5を3と同様にDMSO- $d_6$  : TFA (9:1)中で $^1\text{H}$  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(Fig. 10)。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -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(Fig. 11)。この結果から165.5 ppmの炭素はカルボ

キシル基であり、5は3のメチルエステル体であることが判明した。ここで5の $^1\text{H}$  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、3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環系のキサランチリウム(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 ( $M^+$ )であると推定された。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(485 nm)へと移行した(Fig. 12)。この結果はこれまでに報告されている、1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylum構造の特性と一致した。最終的に高分解マスマスペクトルを用いて、3および5の分子式がそれぞれ、 $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_7$  ( $m/z$  289.03450 ( $M^+$ ),  $\delta$ 0.22 mmu) および  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_7$  ( $m/z$  303.05201

(M<sup>+</sup>,  $\delta$  0.28 mmu)であることを確認した。このようにして、3の化学構造は左右対称なキササンチリウム化合物 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天然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。本色素は黄色タマネギの色素として世界初の報告となった。

### 2-3. 色素ピーク D の単離精製

前節で述べた *cepaic acid* (3) は 430 nm に極大吸収をもつキササンチリウム色素であったが、それだけでは 450nm 近辺に極大吸収をもつタマネギ色素全体の色調を説明することができない。複雑な色素の全体を把握するためにもさらなる色素の構造決定が必要と考えられた。そこで *cepaic acid* よりも分子量が大きく、また 480nm に極大吸収をもつピーク D について単離・構造決定を試みた。

#### 方法

##### 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、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 度繰り返して、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 LC/MS 分析を行った。LC/MS 分析条件は 2-1 に示した条件と同様である、

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% NaHCO<sub>3</sub> 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 D 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、ピーク D は減少し、新たにピーク E が高極性側に出現した。ピーク E はピーク D 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 E 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 C<sub>18</sub>-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
- ・ グラジエント条件：B 移動層を 20 分間で 30%から 70%まで上昇させた。
- ・ 検出：UV (450nm)
- ・ 分取方法：手動

ピーク E は手動でフラスコに集められた。得られた画分中の有機溶媒 (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

前節の cepaic acid (3) の単離方法をもとに精製を試みた。次にできるだけ色素成分の夾雑成分を除去するべくゲルろ過による分画作業を行った。ブタノールに集められた色素画分を減圧乾固し, 得られた色素を NaHCO<sub>3</sub> 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負荷した。水で溶出させた結果, 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。両画分を LC/MS で分析したところ, 目標とする cepaic acid (3) やピーク D のような低分子の色素はバンド 2 に存在することが確認された。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。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, 興味深いことにピーク D は減少し, 新たに低極性側にピーク E が出現した。ピーク E 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, 精製作業中にピーク D 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 C<sub>18</sub> カラムを用いて手動でピーク E の分取を行った。得られたピーク E の画分は集められ, 減圧濃縮後に *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 E の精製画分とした。

得られたピーク E 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 E だけでなく, もともと単離の目標としていたピーク D および低極性に観測されるピーク F の存在が確認された (Fig. 13)。さらに cepaic acid (3) の存在も確認された。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 E の分取作業によって混入したものとは考えられない。またピーク E および新たに観測されたピーク F の吸収スペクトルは, どちらもピーク D とほぼ同じであったことから, ピーク E および F はタマネギ外皮に含まれる天然物ピーク D から精製作業中に生成した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。

#### 2-4 色素ピーク D のエステル誘導体について

## 方法

前節で精製を試みた色素ピーク D 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 2-1 と同じであった。次にピーク D 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、以下のような溶液を各 1 ml 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) 2) 塩酸メタノール, 90°C, 1 時間 (湯浴)
- 3) 3) 塩酸メタノール, 50°C, 15 分 (湯浴)
- 4) 4) 塩酸メタノール, 常温, 12 時間。

反応後のサンプルをそのまま LC/MS に注入して分析を行った。

## 結果および考察

前節で新たに確認された色素ピーク E および F の LC/ESI-MS 分析を行った結果、ピーク E 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(Fig. 14-a)。またピーク F 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(Fig. 14-b)。構造決定された cepaic acid (3) が正に帯電したキササンチリウム構造持っていたことから、ピーク D, E および F も正に帯電していると推定され、ピーク D の分子量は 361, そしてピーク E およびピーク F の分子量はそれぞれ 375 および 417 であると推定された。推定された分子量の差は、ピーク D と E の差が 14, そしてピーク D と F の差が 56 であった。これらは一般的に

メチル基およびブチル基の分子量に相当する。前節のピーク D 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、ピーク E および F はピーク D 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。

NMR 分析を行うためには試料はできるだけ単一であることが望ましい。そこで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 (3) へと変化した。この結果はピーク D が 3 の類縁体であり、何らかの官能基が 3 に置換していることを強く示唆するものであった(Fig. 15)。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°C で反応を行うと、ピーク E の生成だけでなく加水分解による 3 の生成も観察された(Fig. 15)。条件検討の結果、50°C 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、メチルエステル体と考えられるピーク E へ集約されることが確認された(Fig. 15)。

上記の結果から、ピーク **D** が cepaic acid (3)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示唆された。

cepaic acid(3)の分子中にはカルボン酸が含まれているが、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°C で長時間加熱する必要がある。そのため、今回観察されたように、酸存在下におけるアルコールとの濃縮程度でエステル化されるカルボン酸基は cepaic acid 構造内のカルボン酸でないと推定された。ピーク **D** と 3 の分子量の差は ESI-MS 分析の結果から 72 と推定されることから、ピーク **D** においてはカルボン酸基が 3 に置換している可能性が十分に考えられた。

## 2-5 : 色素ピーク **D** のメチルエステル体の NMR 分析

### 方法

前節に記したように、単離された色素ピーク **D** およびそのエステル体を含む画分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ピーク **D** のメチルエステル体(ピーク **E**)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 (CD<sub>3</sub>OD) に溶解させ、NMR チューブ (Ø5 mm) に詰め、<sup>1</sup>H NMR (500MHz)の測定を行った。参考試料として cepaic acid (3)の CD<sub>3</sub>OD における <sup>1</sup>H 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*<sub>6</sub> : TFA(9:1)溶媒に溶解させて <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC スペクトルの測定(800MHz)

を行った。

### 結果と考察

色素ピーク **D** のメチルエステル体(ピーク **E**)を CD<sub>3</sub>OD を溶媒として <sup>1</sup>H 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。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。メチルエステルの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ってはなかった。前節において酸性条件下においてピーク **D** は cepaic acid (3)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。これまで cepaic acid の NMR スペクトルは全て DMSO-*d*<sub>6</sub>:TFA(9:1)中で測定されているため、今回 cepaic acid の <sup>1</sup>H 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。それゆえ、ピーク **E** の <sup>1</sup>H 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 DMSO-*d*<sub>6</sub>-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 <sup>1</sup>H NMR スペクトルを得ることが出来なかつ

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。またメチル基に相当する明確なピークは  $\text{CD}_3\text{OD}$  中の分析同様に確認されなかった。 $^{13}\text{C}$  NMR の測定も行ったが、量的な問題のため十分な分解能のスペクトルを得られなかった。そこで  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC の測定を行った。その結果、5.80 ppm の水素原子は 95.4 ppm の炭素にそして、6.34 ppm の水素は 100.8 ppm の炭素に相関がみられた。続いて、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC の測定を行ったところ、5.80 ppm の水素からは 101.3 ppm, 165.2 ppm, および 169.2 ppm の炭素へ相関が観測された。また 6.34 ppm の水素からは 96.0 ppm, 102.8 ppm, 161.0 ppm および 168.6 ppm への相関が観測された。これらの結果から、もし 5.80 ppm および 6.34 ppm のピークが色素ピーク E に相当するピークだとしたら、2つの水素から同じ炭素への相関がないことを示している。これは左右対称で2つの水素シグナルから同じ炭素への相関が観測された *cepaic acid* (3) のパターンと違い、*xanthylum* 環の左右それぞれの環に、環境の違う水素原子が1つずつ存在し、それぞれの環の炭素シグナルへ相関が観測されていることを示すものであった。色素ピーク D は *cepaic acid* の類縁体であることが強く示唆されているが、もしそうであるとしたら、*cepaic acid* の左右の環にそれぞれ官能基が1つずつ置換していることが推定される。しかしながら、このように夾雑ピークがまだ多く観測され、また 800 MHz という高分解能を持つ NMR 機器を用いても満足な  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルが観測されない状態では、完全な構造決定には至らなかった。