

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

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分子のフロログルシノール(4, phloroglucinol)が、アルデヒド酸であるグリオキシル酸 (6, glyoxylic acid) 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。そこでフ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。

方法

試薬：フ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：フ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

C₁₈-MS-II (4.6 x 250 mm)

移動相：A 0.1%ギ酸入りH₂O, 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

キササンチリウム構造はfluoresceinやrhodamine,そして人工着色料の1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プは、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(Fig. 16)。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、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(Fig. 17)。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(Fig. 18)。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(Fig. 19)。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(Fig. 19)。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(Fig. 19)。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(Fig. 20 & 21)。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(Fig. 22)。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。これはキサラ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—閉環反応が進行するの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(Fig. 23)。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ラ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(Fig. 24)。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ラ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 が正に帯電した構造をもつため、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

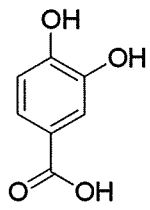
プルを添加した。その後、濾紙を泳動液 (Tris-HCl 緩衝液 pH7.5) にサンプルが流れないように注意深く浸し、電気泳動装置へと設置した。電気泳動のための電圧は 150V とし、30 分間泳動を行った。

C 研究結果・考察

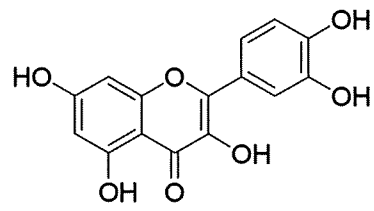
カカオ、カキ、コウリヤン、タマリンド、タマネギの 5 種 7 検体の水溶液を濾紙に津ポットし、泳動液として中性域の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を用いて電気泳動を行ったところ、全ての色素が陰極側へと移動した (Fig. 25)。その移動距離は 15 mm であり、色素間に移動度の差違は見られなかった。クエルセチンを同様の条件で電気泳動した場合、スポットは原点に留まったままであった (Fig. 26)。

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、展開液としては不相当であった。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

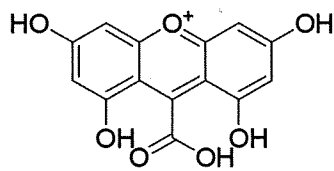
動度に差違が見られなかった。これは色素のそれぞれがほぼ同じ化学構造をもつためなのか、条件設定によるものなのかはまだ判らない。移動度の一致が同種の化学構造のためであるとしたら、褐色色素の化学構造の解明に大きな前進が期待できる。



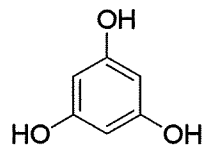
1



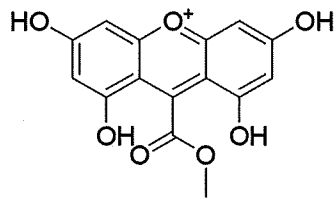
2



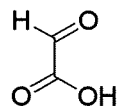
3



4



5



6

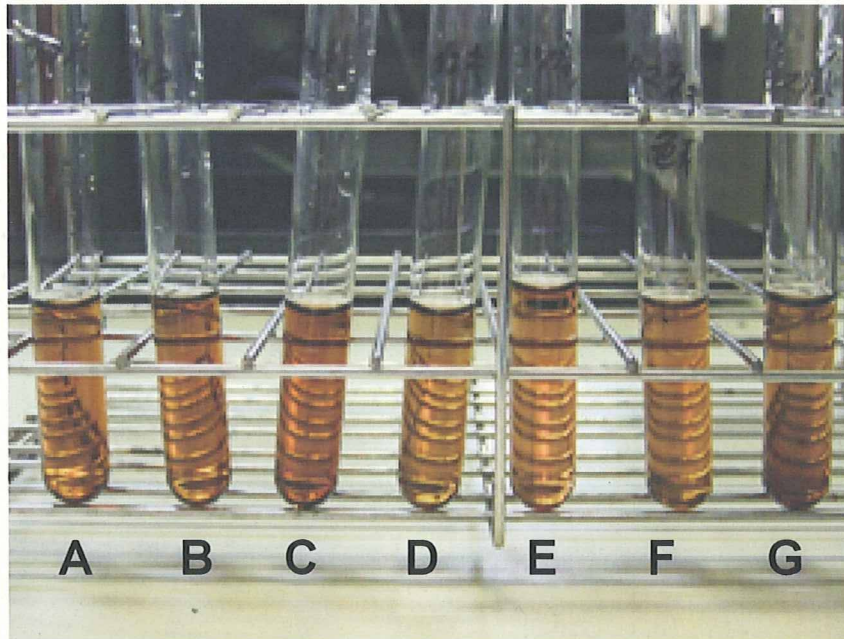


Fig. 1 : フラボノイド系褐色色素の水溶液。A: カカオ色素(1)、B: カカオ色素(2)、C: カカオ色素(3)、D: カキ色素、E: コウリヤンオ色素、F: タマネギ色素、G: タマリンド色素

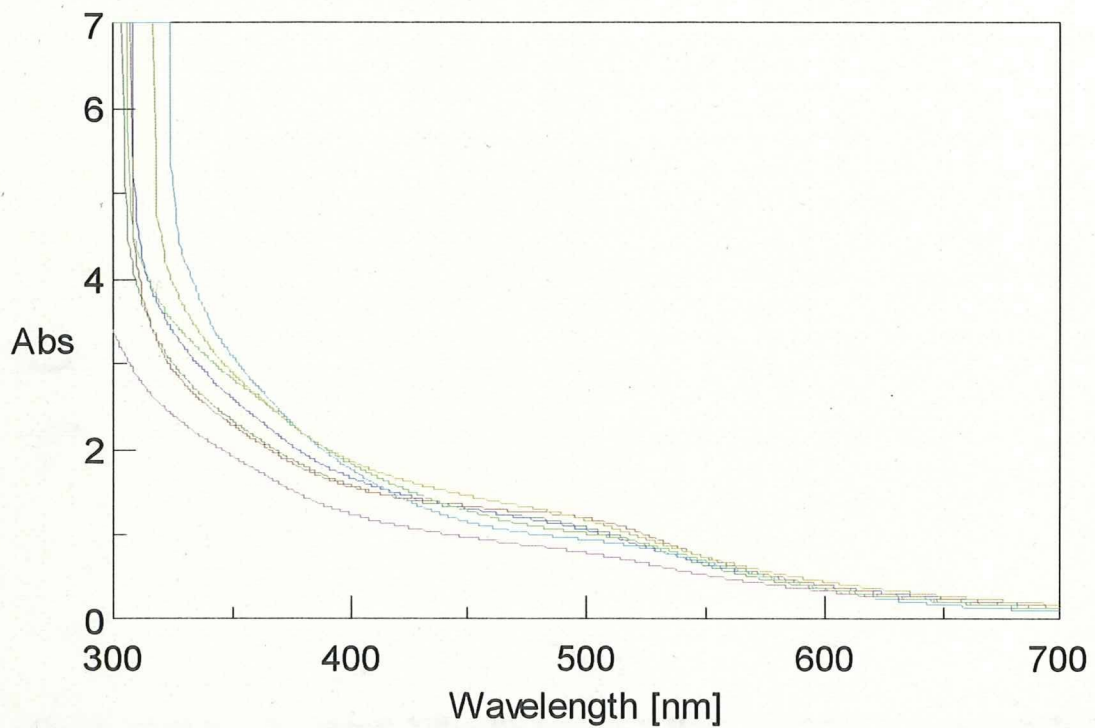


Fig. 2 : フラボノイド系褐色色素水溶液のUV-Vis吸収スペクトラム。A: カカオ色素(1)、B: カカオ色素(2)、C: カカオ色素(3)、D: カキ色素、E: コウリヤンオ色素、F: タマネギ色素、G: タマリンド色素

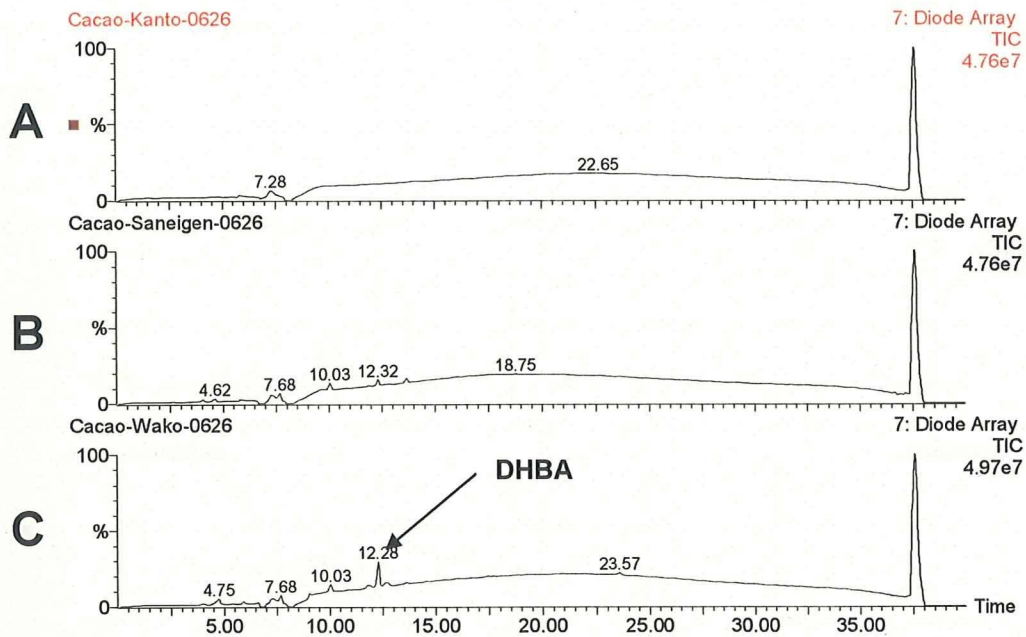


Fig. 3-a : A: カカオ色素(1)、B: カカオ色素(2)、C: カカオ色素(3)の逆相HPLCチャート(検出TIC(190~600 nm))

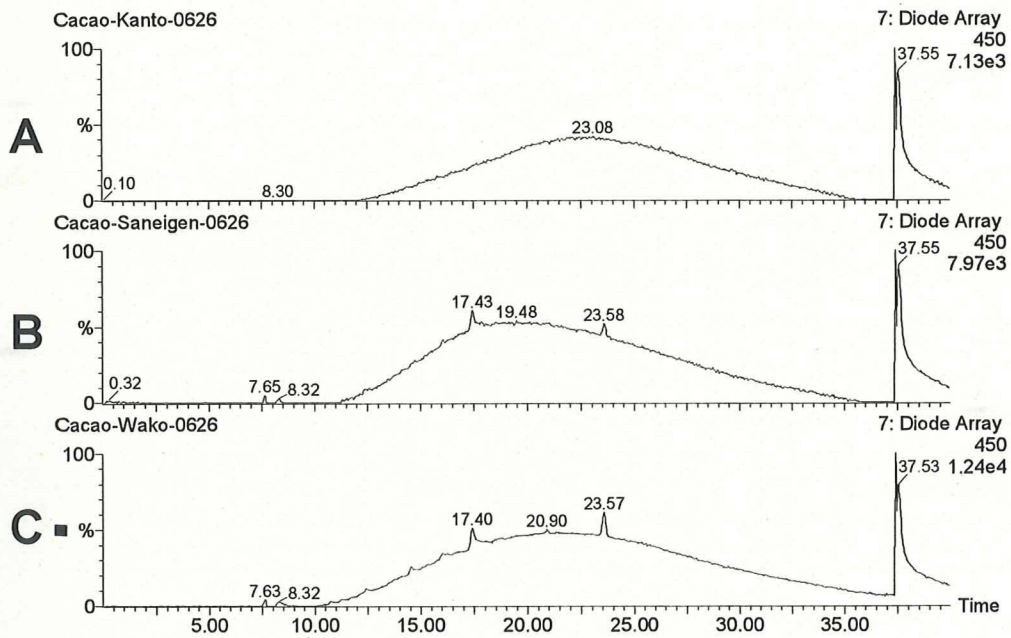


Fig. 3-b : A: カカオ色素(1)、B: カカオ色素(2)、C: カカオ色素(3)の逆相HPLCチャート(検出 450 nm)

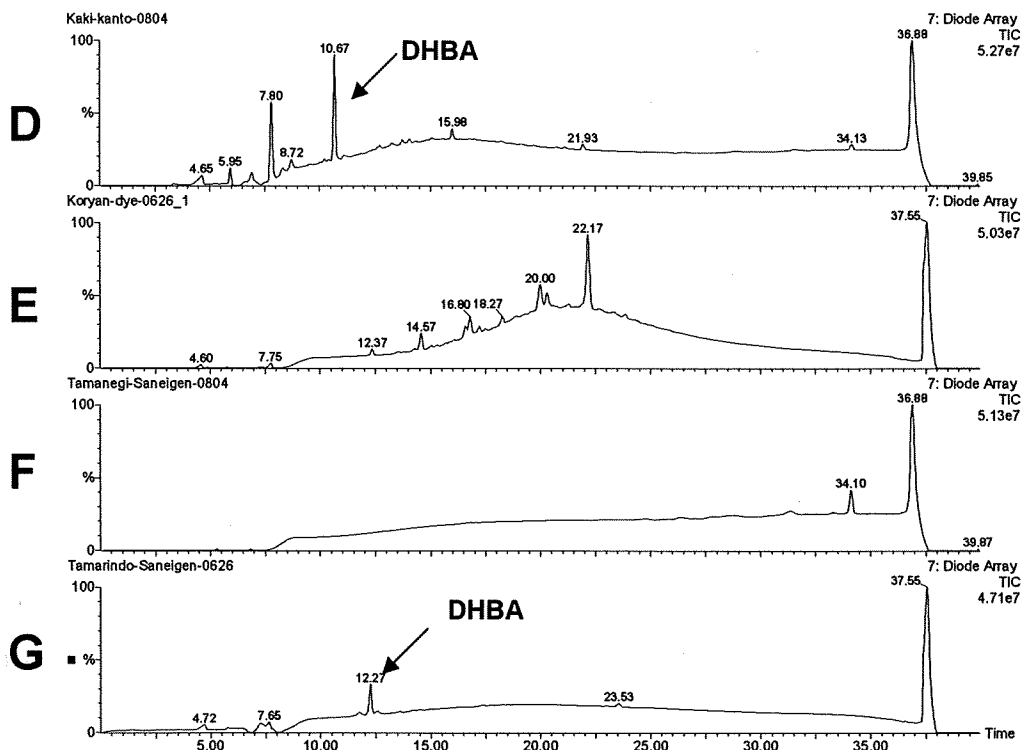


Fig. 3-c : D: カキ色素、E: コウリャンオ色素、F: タマネギ色素、G: タマリンド色素の逆相HPLCチャート(検出TIC (190~600 nm))

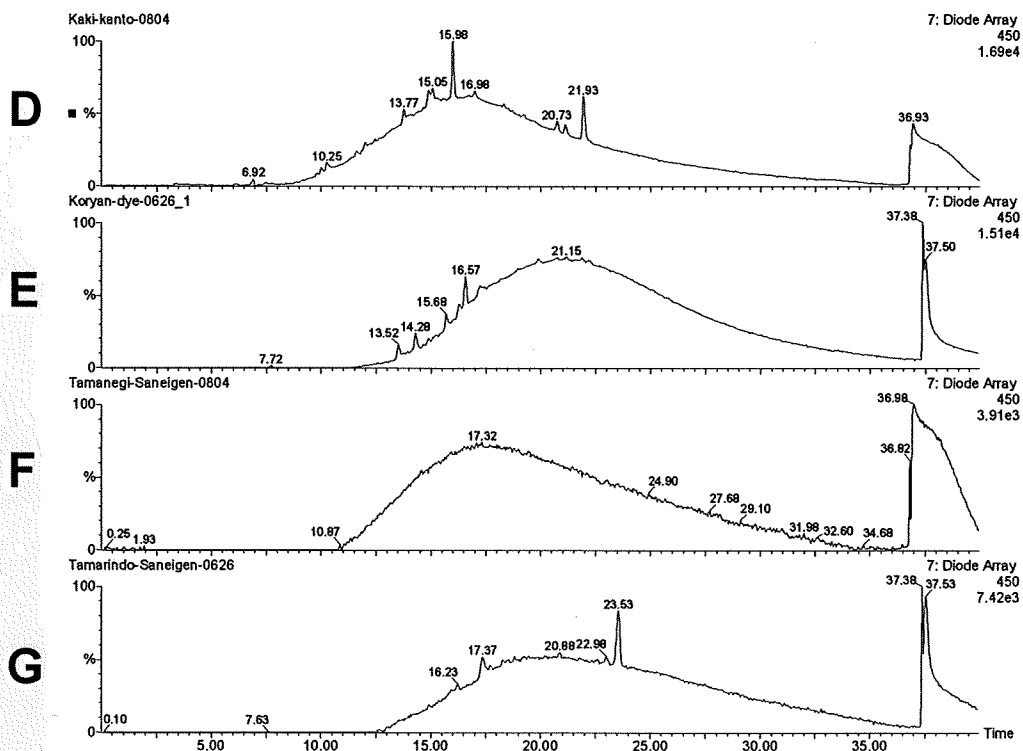


Fig. 3-d : D: カキ色素、E: コウリャンオ色素、F: タマネギ色素、G: タマリンド色素の逆相HPLCチャート(検出450nm)

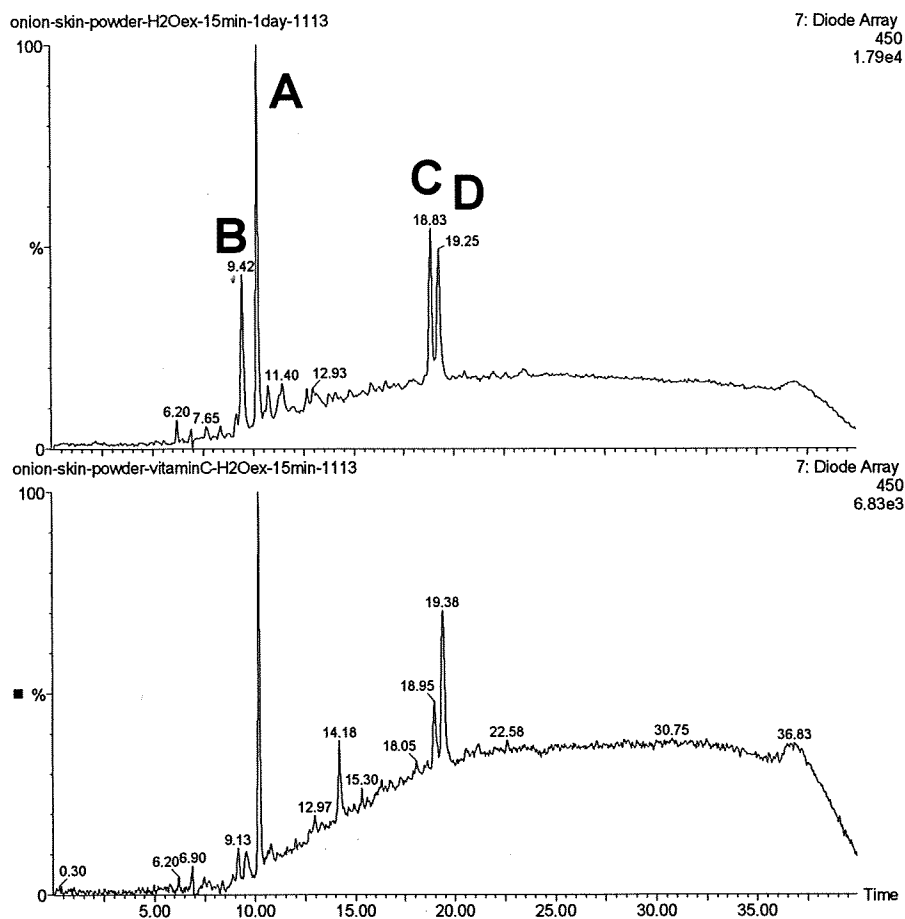


Fig. 4: 黄色タマネギ外皮抽出液のLC/MS分析結果: 検出450 nm

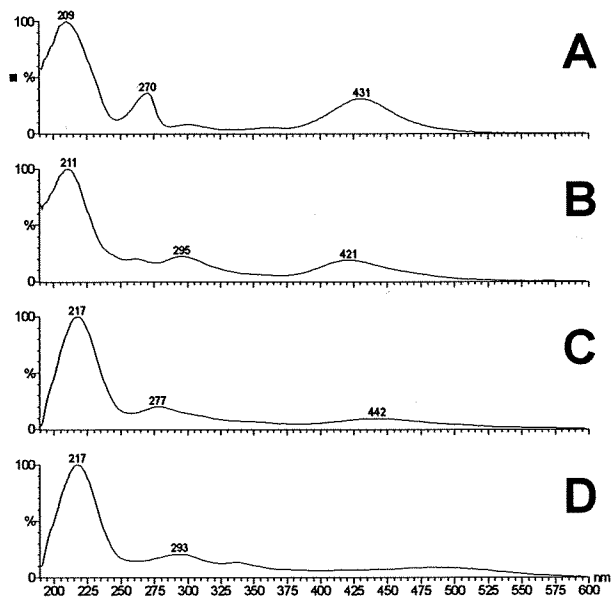


Fig. 5: タマネギ外皮抽出液中の色素ピークA-DのUV-Vis. 吸収スペクトル

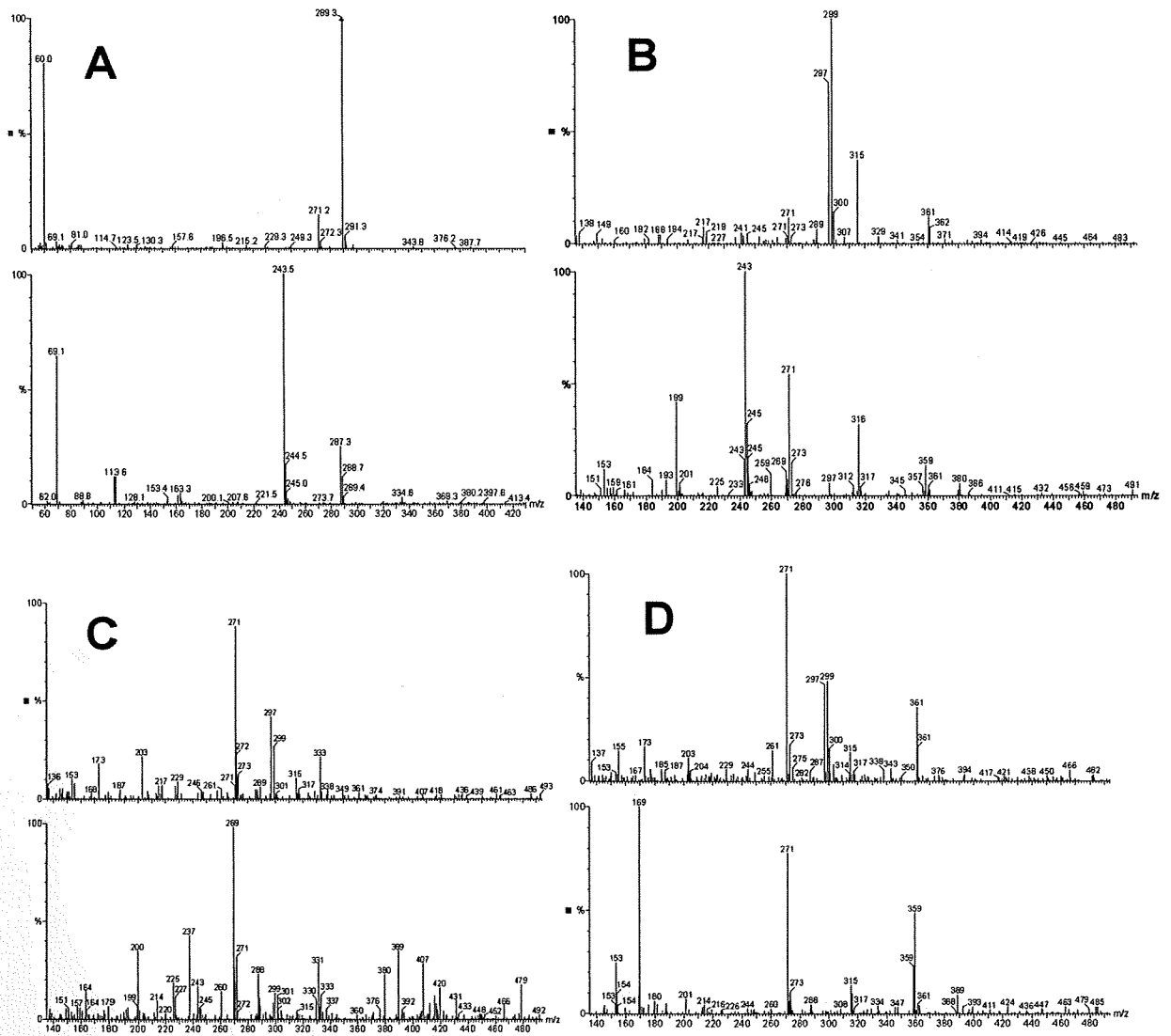


Fig. 6 : 黄色タマネギ外皮抽出物中のピークA - D のESI-MSスペクトラム
 (上段 : 正イオンモード、下段 : 負イオンモード)

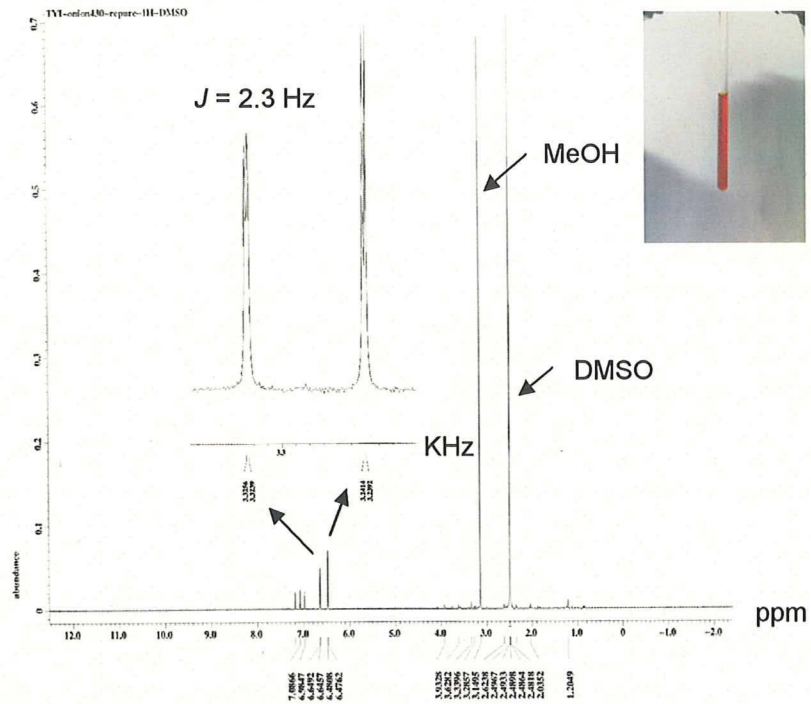


Fig. 7 : cepaic acidの ^1H NMR spectrum (溶媒 $\text{DMSO-}d_6/\text{TFA}$ (9 : 1))

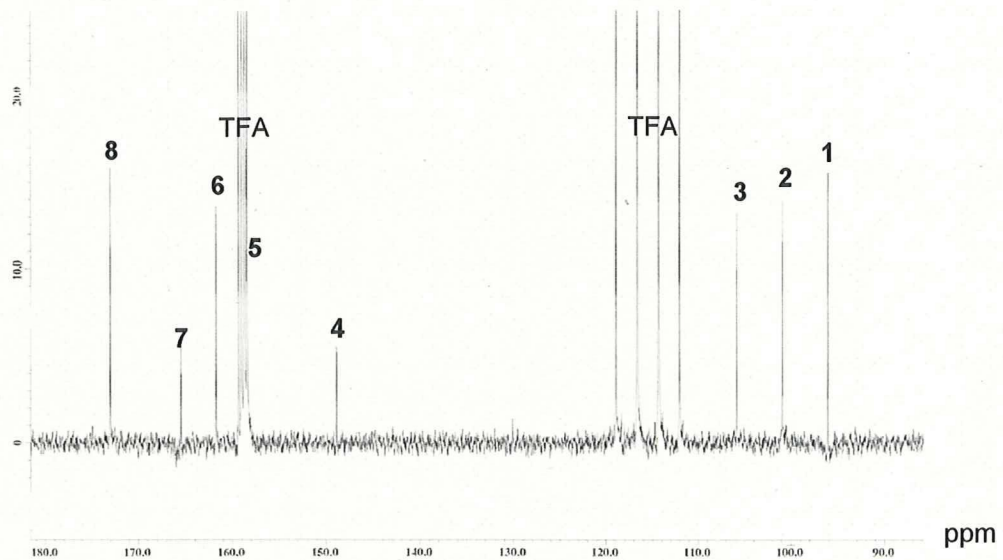


Fig. 8 : cepaic acidの ^{13}C NMR spectrum (溶媒 $\text{DMSO-}d_6/\text{TFA}$ (9 : 1))

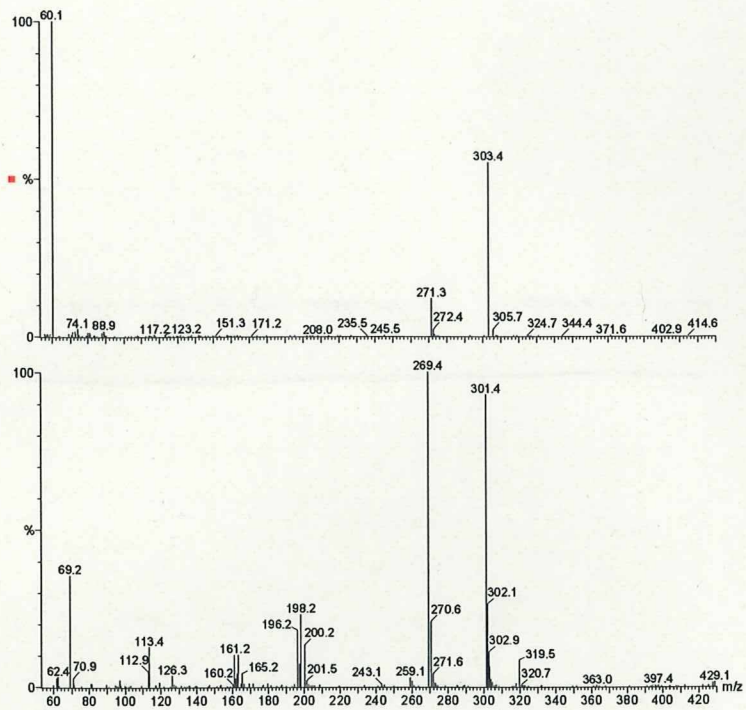


Fig. 9 : cepaic acid (3) のmethyl esterのESI-MSスペクトラム
(上段 : 正イオンモード、下段 : 負イオンモード)

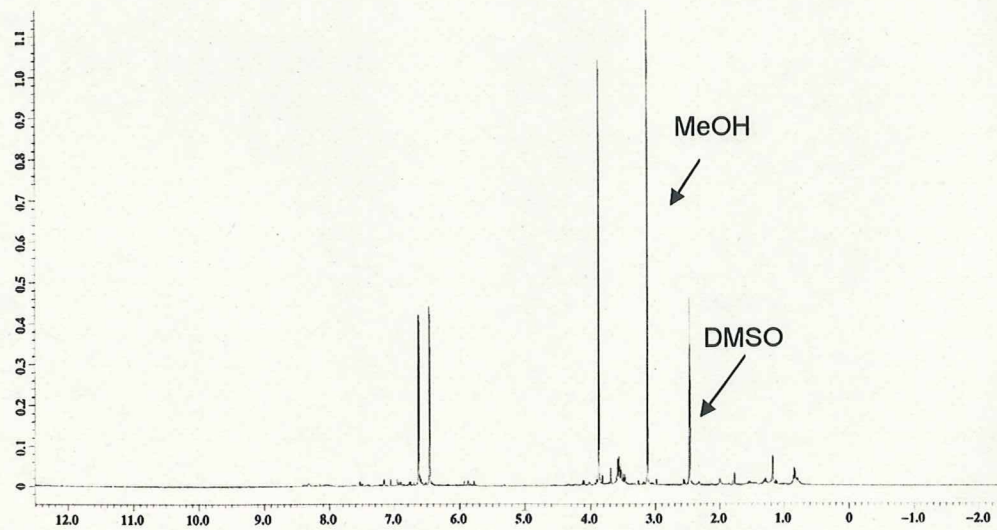


Fig. 10 : cepaic acid (3) methyl ester の ^1H NMR spectrum
(溶媒 $\text{DMSO}-d_6/\text{TFA}$ (9 : 1))

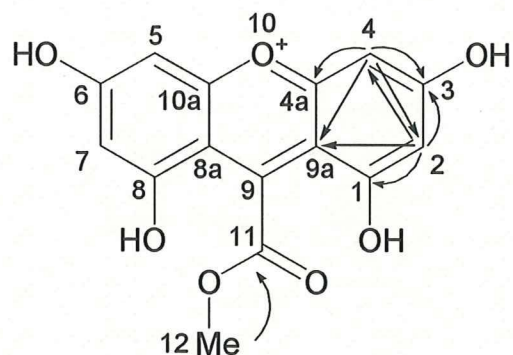


Fig. 11 : cepaic acid methyl esterの ^1H - ^{13}C HMBC相関図

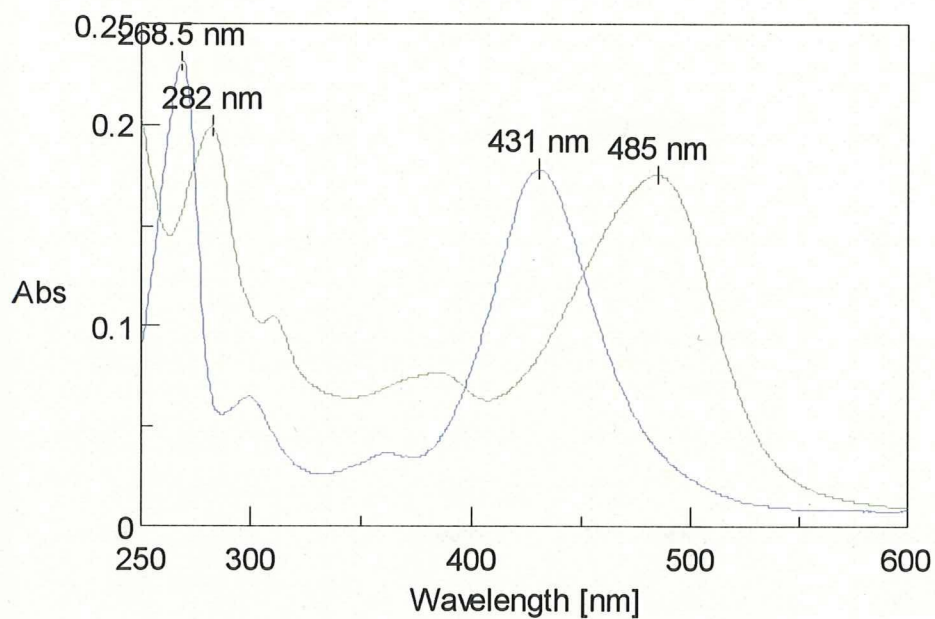


Fig. 12 : cepaic acidのUV-Visスペクトル, 青:酸性 (pH2.8) 緑:アルカリ性 (pH9.8)

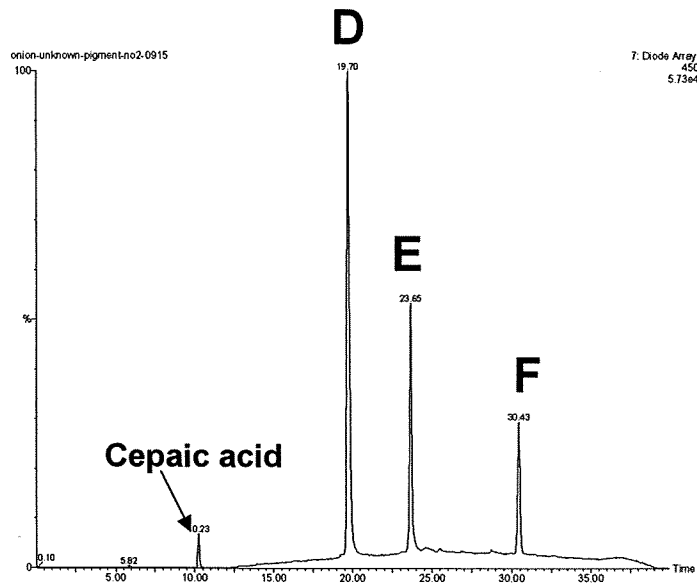


Fig. 13 : 色素ピークDの精製中に確認されたピークEのHPLC精製後の純度確認。

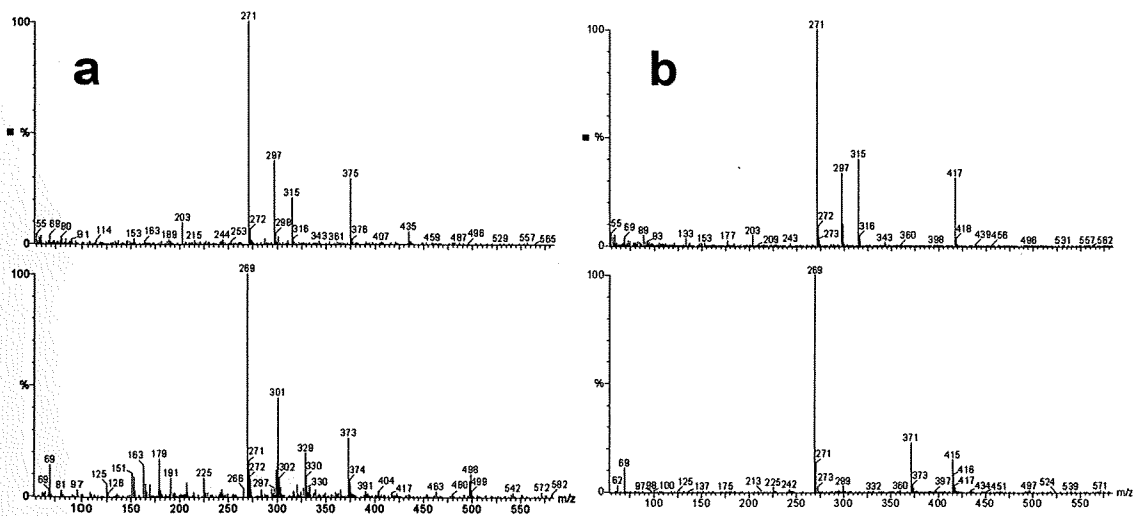


Fig. 14 : 色素ピークE (a)およびピークF (b)のESI-MSスペクトラム(上段：正イオンモード、下段：負イオンモード)

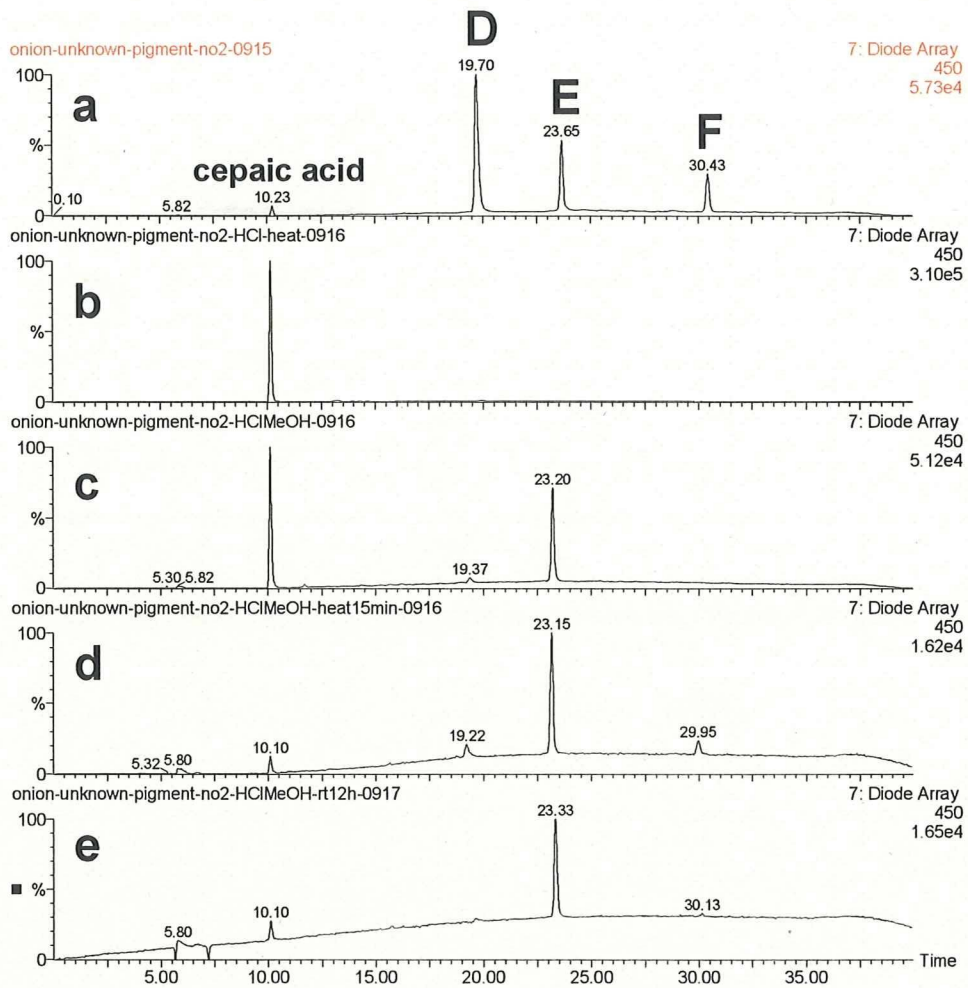


Fig. 15 : 色素ピークD, E, Fの混合物の加水分解反応およびエステル交換反応 (逆相HPLCクロマトグラム、検出450 nm)、a) 反応前、b) 6N HCl、90°C、2時間 (湯浴)、c) 塩酸メタノール、90°C、1時間 (湯浴)、d) 塩酸メタノール、50°C、15分 (湯浴)、e) 塩酸メタノール、常温、12時間

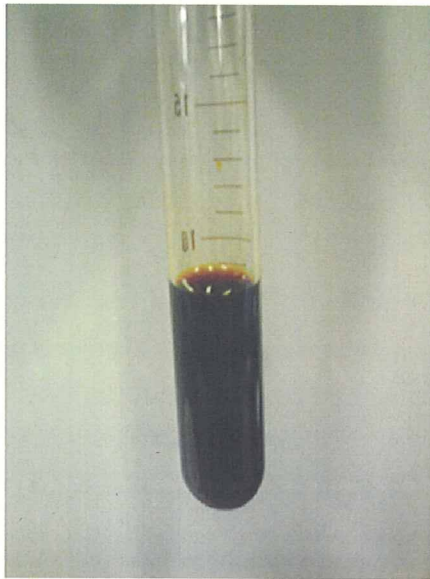


Fig. 16 : フロログルシノールとグリオキシル酸混合液の褐変の様子

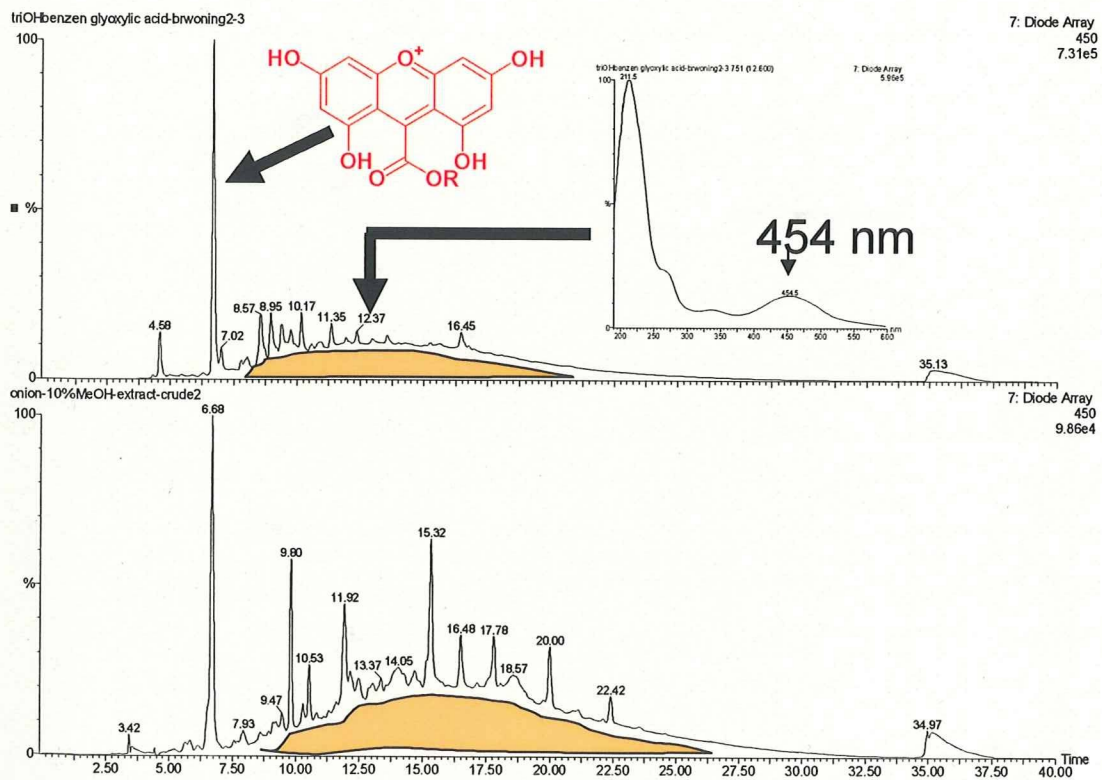


Fig. 17 : フロログルシノールとグリオキシル酸混合液 (上段) およびタマネギの乾燥外皮 (下段) の逆相HPLCチャート図 (検出: 450nm)

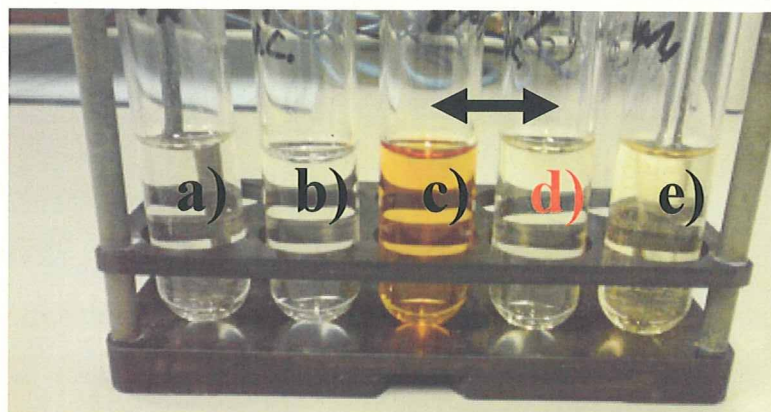


Fig. 18 : 緩衝液中 (10mM Tris-HCl buffer pH 7.5)におけるフロログルシノール(50 mM)とグリオキシル酸(25 mM) もしくはアセトアルデヒド混合液(25 mM)の褐変の様子。a) 緩衝液、b) 緩衝液+アスコルビン酸、c) グリオキシル酸、d) グリオキシル酸+アスコルビン酸、e) アセトアルデヒド

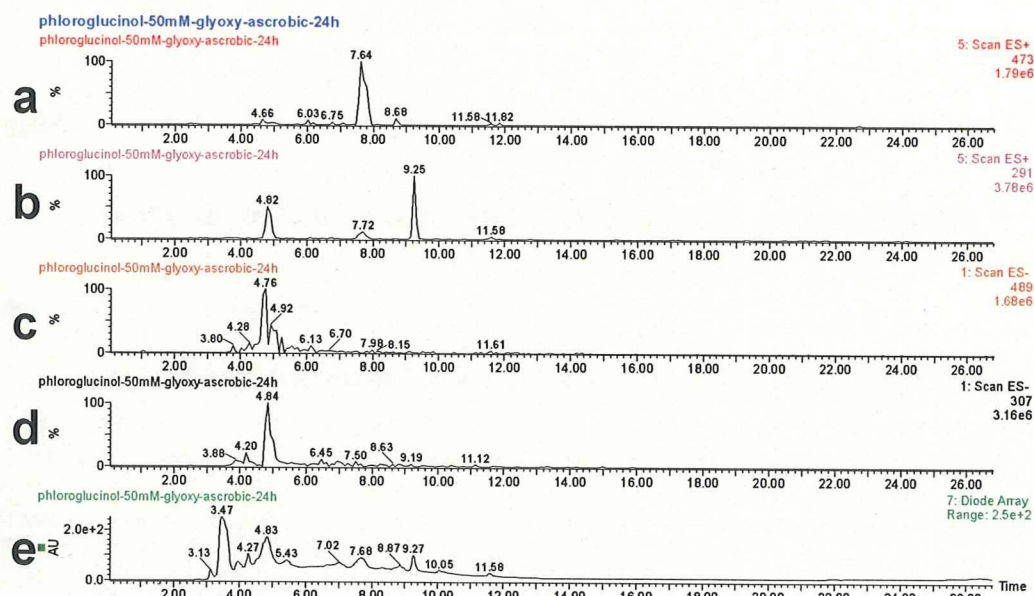
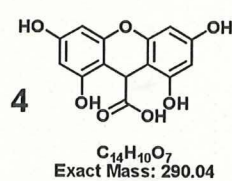
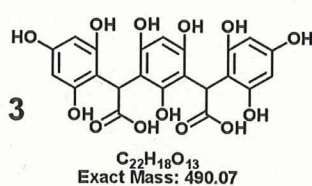


Fig. 19 : アスコルビン酸存在下 (還元状態下)におけるフロログルシノール(50 mM)とグリオキシル酸(25 mM)混液のLC/MS分析の結果。a) m/z 473 (positive mode), b) m/z 291 (positive mode), c) m/z 489 (negative mode), d) m/z 307 (negative mode), e) TIC:UV-vis. (190-600 nm)



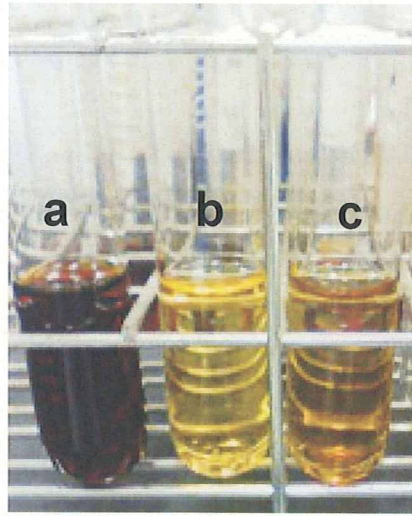


Fig. 20 : フロログルシノール (50 mM)にa):グリオキシル酸 (25 mM)、b):ホルムアルデヒド(25 mM)、c):アセトアルデヒド(25 mM)を加えたときの褐変の様子

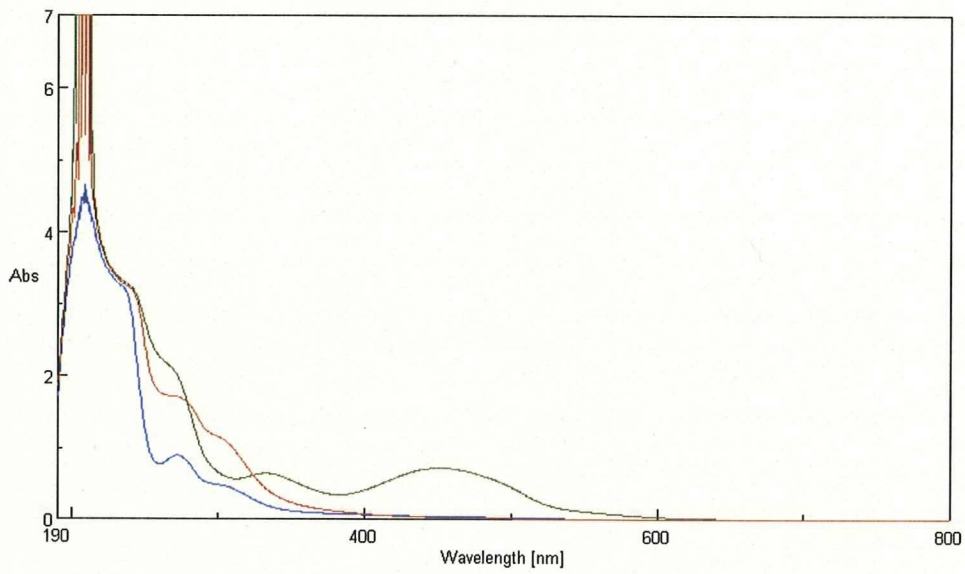


Fig. 21 : フロログルシノール (50 mM)に緑):グリオキシル酸 (25 mM)、青):ホルムアルデヒド(25 mM)、茶):アセトアルデヒド(25 mM)を加えた混合液のUV-Vis.スペクトル図

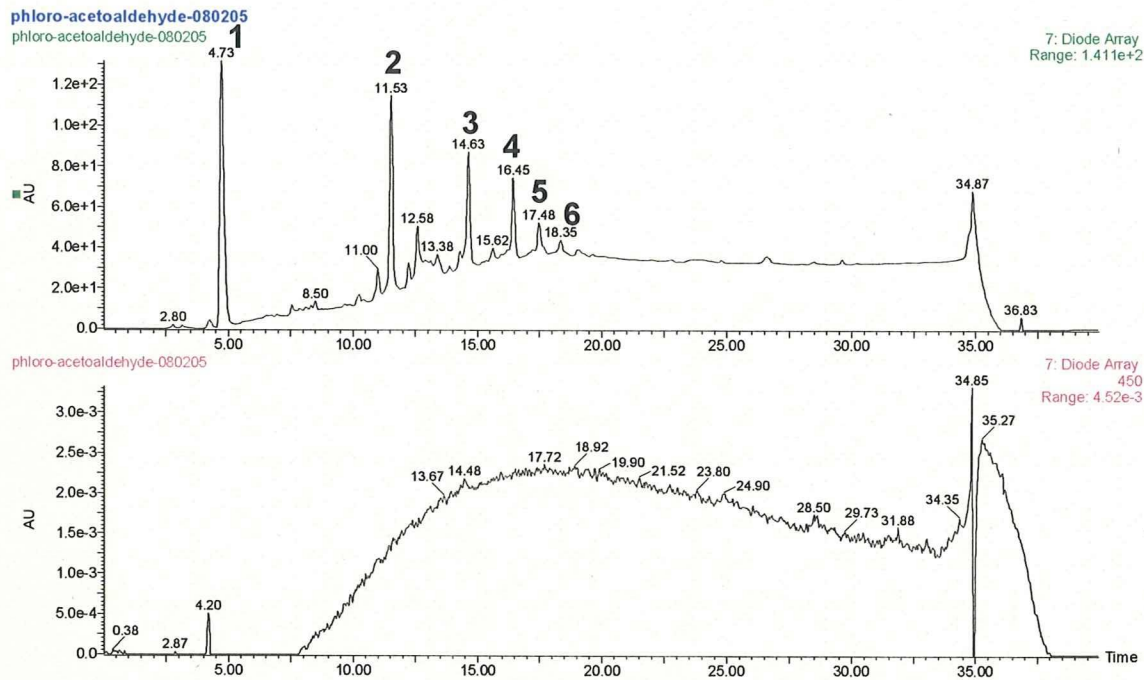


Fig. 22 : フロログルシノールとアセトアルデヒドの反応物のHPLC分析結果 (上段:TIC、下段:450nm)

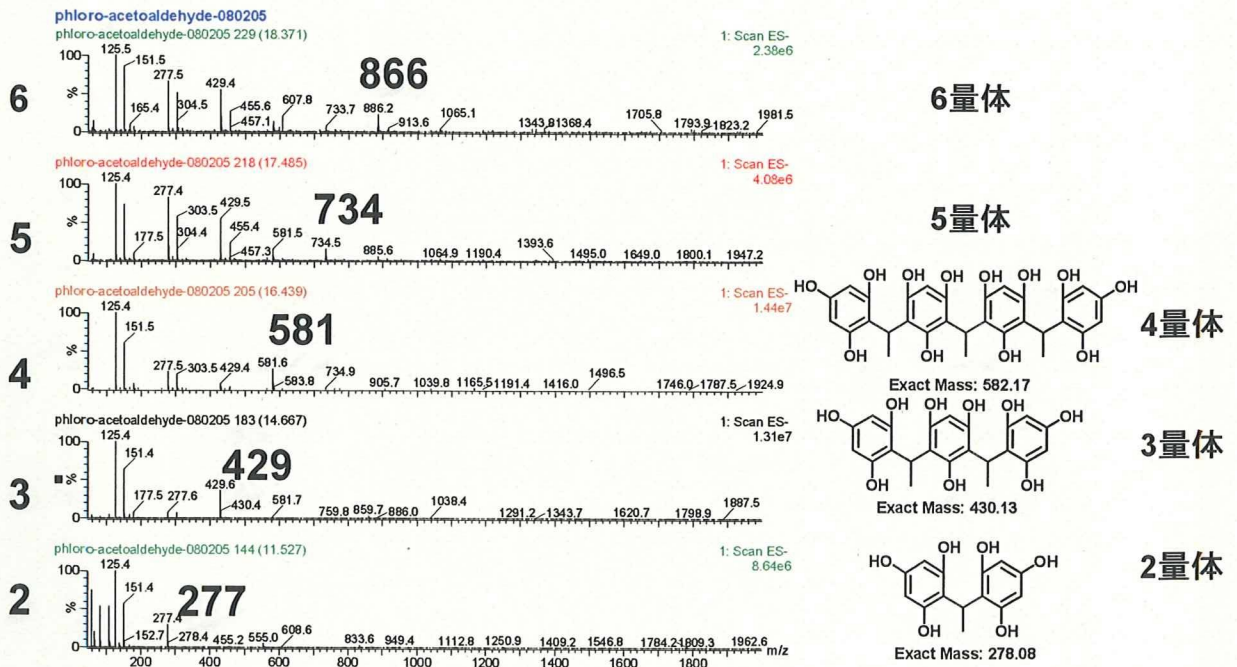


Fig. 23 : Fig. 20で示されたフロログルシノールとアセトアルデヒドの反応物 (2-6)のESI-MS 分析結果 (1はフロログルシノール)