

部会	用途	整理番号	原産No.	自主規格 No.	既存添加物名称	自主規格 第4版品目等 フリガナ	JIS規格	JECFA規格	FCC規格	EU規格	日局・局外規	外規規・薬添規	他の国内規格	他の海外規格	重金属規格値	鉛規格値	鉛規格値	鉛規格値	鉛規格値	鉛規格値	成分規格名	鉛規格値	鉛試験法	成分規格名	鉛規格値	鉛試験法	カドミウム規格値	カドミウム規格値	カドミウム規格値	カドミウム規格値	カドミウム規格値	カドミウム規格値	備考					
																																		①	②	③	④	⑤
05	酸化防止剤	0580	091	122	カチキン(チャカテキン)	チャカテキン	2	×	◎						40	10	×	×	×	×														Pbとして10μg/g以下				
13	製造用剤	2010	201	123	201	チャカテキン	チャカテキン	1	◎						5	×	×	×	×	×				FCC: Tea/Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives including distillate (182/20)														
06	ガムベース	2030	203		テルテ	テルテ	1	×	×	○	×				×	×	×	×	3	×				FCC: masticatory substances natural chicle	Not more than 3mg/kg	lead limit test Appendix IV										第3次消滅復活品目		
06	ガムベース	2050	205		ツヌー	ツヌー	1	×	×	○	×				×	×	×	×	3	×				FCC: masticatory substances natural chicle	Not more than 3mg/kg	lead limit test Appendix IV										第3次消滅復活品目		
06	ガムベース	2080	208	126	208	低分子ゴム	テイブシゴム	1							40	10	×	×	3	×				FCC: masticatory substances natural rubber	Not more than 3mg/kg	lead limit test Appendix IV										第3次消滅復活品目		
09	香料	2090	209		テオブロミン	テオブロミン	0	×	×	×	×	○			×	×	×	×	×	×	サリチル酸ナトリウム・テオブロミン	重金属Pbとして10μg/g以下	第二法															
13	製造用剤/強化剤	2120	212		鉄	テツ	0	◎	○																													
13	製造用剤	2140	214		銅	ドウ	0	◎	○																													
03	製造用剤/日持	2160	216	129	216	トウガラシ水性抽出物	トウガラシイセイトウガラシ抽出物	2	×	◎																												
13	製造用剤	2270	227	133	227	トレハロース	トレハロース	1	◎																													
04	増粘安定剤	2290	229	135	229	トロロアオイ	トロロアオイ	0	◎	○					20	10																						
13	製造用剤	2310	231			ナフサ	ナフサ	2	◎	△																												
05	酸化防止剤	2320	232	136	232	生コーヒ豆抽出物	ナマコーヒ豆抽出物	1	◎						20	-																						
06	ガムベース	2350	235			ニガーグッタ	ニガーグッタ	1	◎	○																												
09	香料	2360	236	139	236	ニガヨモギ抽出物	ニガヨモギ抽出物	1	◎						10	-																						
13	製造用剤	2370	237	140	237	ニッケル	ニッケル	0	◎	○																												
02	着色料	9110	911		911	ワリ色素	ワリ	0	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	2390	239			バイセンコメヌカ	バイセンコメヌカ	0	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	2400	240			ばい菌ダイズ抽出物	バイ菌ダイズ	3	◎	○	×	×	×	×																								
02	着色料	9120	912		912	ハイビスカス色素	ハイビスカス	1	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	2420	242			自白	ハクセン	1	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	2460	246			パタジウム	パタジウム	0	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	2490	249	143	249	ヒアルロン酸	ヒアルロン酸	1	◎	○	×	×	×	×	20	-																						
05	酸化防止剤	2550	255	144	255	ヒマワリ種子抽出物	ヒマワリ種子抽出物	0	◎	○	×	×	×	×	20	-																						
13	製造用剤	2560	256			ヒルイシ	ヒルイシ	3	◎	○	×	×	×	×																								
04	増粘安定剤	2570	257	146	257	ファセラン	ファセラン	1	◎	○	○	×	×	×	40	10	5	5																				
02	着色料	2580	258	147	258	ファフィア色素	ファフィア色素	1	◎	○	×	×	×	×	40	10																						
13	製造用剤	2620	262	151	262	フィチン(抽出物)	フィチン抽出物	1	◎	○	×	×	×	×	40																							
13	強化剤	2630	263	152	263	フェリチン	フェリチン	0	◎	○	×	×	×	×	20																							
13	製造用剤	2660	266			ブタン	ブタン	1	◎	○	○	×	×	×																								
02	着色料	9130	913		913	ブドウ果汁色素	ブドウ果汁色素	0	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤/日持ち	2680	268	154	268	ブドウ果皮抽出物	ブドウ果皮抽出物	0	◎	○	×	×	×	×																								
01	甘味料	2700	270	156	270	ブラジルカンゾウ抽出物	ブラジルカンゾウ抽出物	0	◎	○	×	×	×	×																								
02	着色料	9140	914		914	ブラックベリー色素	ブラックベリー	0	◎	○	×	×	×	×																								
02	着色料	9150	915		915	ブルーベリー色素	ブルーベリー	0	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	2750	275			プロバシ	プロバシ	1	◎	○	×	×	×	×																								
05	酸化防止剤	2760	276			プロバシ抽出物	プロバシ抽出物	1	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	1553	155	180	155	シクロキチン-3(分枝)	シクロキチン-3(分枝)	0	◎	○	×	×	×	×																								
130	製造用剤/ガムベース	2810	281			粉末モミガラ	粉末モミガラ	1	◎	○	×	×	×	×																								
02	着色料	2820	282	161	282	ベカンナツツ色素	ベカンナツツ色素	0	◎	○	×	×	×	×	40	10																						
05	酸化防止剤	2870	287			ヘゴイチョウ抽出物	ヘゴイチョウ抽出物	3	◎	○	×	×	×	×	10	-																						
06	ガムベース	2950	295			ベネズエラチクル	ベネズエラチクル	3	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	2970	297			ヘプタン	ヘプタン	5	◎	○	×	×	×	×																								
13	製造用剤	3020	302			ヘリウム	ヘリウム	0	◎	○	○	×	×	×																								
02	着色料	9160	916		916	ポイセンベリー色素	ポイセンベリー	0	◎	○	×	×	×	×	40	10																						
05	酸化防止剤	3060	306	173	306	透食子酸	透食子酸	1	◎	○	×	×	×	×	20	-																						
06	ガムベース	3070	307	174	307	ホホバロウ	ホホバロウ	0	◎	○	×	×	×	×	20	10																						
02	着色料	9170	917		917	ホワートルベリー色素	ホワートルベリー	0	◎	○	×	×	×	×	40	10																						
06	ガムベース	3120	312	176	312	マスチック	マスチック	0	◎	○																												

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の品質評価と規格試験法に開発に関する研究
平成24年度分担研究報告書

タマネギ色素の色素構造に関する研究
黄色タマネギ外皮由来の赤橙色色素の構造決定

協力研究者 伊藤裕才 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

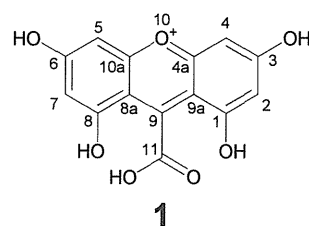
研究要旨 既存添加物「タマネギ色素」は、黄色タマネギの乾燥外皮から得られる橙色～褐色の色素である。これまでに乾燥外皮からは、xanthylum 構造をもつ cepaic acid だけが報告されているが、黄色の cepaic acid だけでは外皮の色調を説明できない。昨年、外皮から単離精製した赤橙色の新規色素は、cepaic acid のケトカルボン酸置換体であったが、最終的な構造決定には至らなかった。今回 UPLC/Tof-MS を用いて新規色素の精密質量解析を行い、さらに置換基の重水素置換を試み、各種 NMR 分析を用いて構造決定を達成した。新規色素の構造は 4-ketocarboxylcepaic acid と判明した。

A. 研究目的

既存添加物「タマネギ色素」はタマネギの乾燥した鱗茎（外皮）をアルカリ水溶液または含水アルコールで抽出することで得られる橙色～褐色呈する着色料である。タマネギ色素は光や熱に対して安定であり、また pH の変化によって色調が変化しないことから食品の着色に多用されている。タマネギ色素の色素成分はクエルセチン(queracetin)であるといわれてきた。しかし、クエルセチンの極大吸収波長は 380nm 近辺であり、これはタマネギ色素の極大吸収(450～480nm)を説明できない。最近、我々はタマネギ外皮の水抽出物から色素成分を探索し、高極性画分から低分子量の黄色色素 cepaic acid(1)を単離し構造決定した。¹⁾これは黄色タマネギ外皮の色素成分として初めての報告となった。

黄色色素 cepaic acid (1) の構造は 9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylum であり、2 つのフロログルシノールがグ

リオキシル酸で架橋された後、フロログルシノール間で脱水し閉環して生成すると考えられた。



実際に試験管内でフロログルシノールとグリオキシル酸を混合した結果、1 を含む橙色～褐色色素の生成が確認された。¹⁾フロログルシノールはクエルセチンの酸化分解物であるため、1 を含む黄色色素は、鱗茎が乾燥する際にクエルセチンが酸化分解し再構成されたものと推定されている。

黄色タマネギ外皮の抽出液を逆相 HPLC 分析すると、色素成分は幅広いブロードピークとして観測される。そのため、高極性部にピークとして発見された 1 以外の色素成分については未解明である。また 1 の極大吸収波長は 430nm（黄色）であり、赤橙色をしたタマネギ外皮の吸収スペクトルの全てを説明すること

はできない。そのため、1 以外の色素成分についても構造決定を進める必要がある。昨年度(23 年度), 外皮の抽出液から赤橙色の新規色素 2 の単離精製に成功した。NMR による構造解析の結果, 2 は 1 に α -ケトカルボン酸が置換した構造と推定されたが最終決定には至らなかった。

本年度は, UPLC/Tof-MS を用いて 2 の精密質量解析を行い, さらに NMR 解析および化学分解等によってその全構造を解明したので報告する。

B. 研究方法

1. 試料

- ・市場で購入した黄色タマネギの外皮
- ・既存添加物「タマネギ色素」製造用の外皮。三栄源・エフ・エフ・アイ株式会社より分譲を受けた。

2. 試薬

メタノール(特級, HPLC 用特級), アセトニトリル(HPLC 用特級), 酢酸エチル(特級)は和光純薬(株)から購入した。塩酸メタノールは東京化成(株)から購入した。塩酸(特級)およびトリフルオロ酢酸(TFA)は和光純薬(株)から, ギ酸(HCOOH; 特級 98%)はシグマアルドリッチジャパン(株)から購入した。無水硫酸ナトリウム(特級)は和光純薬(株)から購入した。水は MilliQ 水を用いた。

3. 装置・器具

- ・UPLC/TOF-MS(飛行時間型液体クロマトグラフ質量分析装置)

UPLC system: Waters Acquity H-class

Tof-MS: Xevo-Tof G2MS

- ・NMR(日本電子(株)) ECA-600
- ・シリンジフィルター: GD/X シリンジフィルター(ワットマン(株)) PVDF

membrane, 孔径 0.45 μ m, 25 μ m

- ・ミルサー: IFM-800DG(岩谷産業(株))
- ・濾紙: 分析用濾紙(直径 150mm):(東洋濾紙(株))

4. タマネギ外皮抽出液の UPLC/Tof-MS 分析

市場で購入した黄色タマネギから乾燥外皮(2.2 g)を採取し, ミルサーで粉碎した後, 20%メタノール(100mL)を加えて 90 分間攪拌した。粗抽出液をブフナー漏斗で濾過し, さらにシリンジフィルターで濾過した。得られた抽出液を以下の条件で UPLC/Tof-MS 分析に供した。

UPLC 条件

- ・カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m(2.1 *i.d.* \times 50 mm, Waters 社製)
- ・移動相: A) 0.1%ギ酸入り水, B) 0.1%ギ酸入りアセトニトリル
- ・グラジエント条件: B 移動相を 15 分間で 0%から 60%まで上昇させた。
- ・流量: 0.3 mL/min
- ・カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
- ・試料注入量: 5.0 μ L
- ・紫外可視部検出器: Photo diode array (PDA)による(検出範囲 190-600 nm), 黄色色素の検出波長 450nm

Tof-MS 条件

正イオンモード, キャピラリー電圧: 3.0 kV, コーン電圧: 30 V, ソース温度: 120 $^{\circ}$ C, 脱溶媒温度: 450 $^{\circ}$ C, 脱溶媒ガス流量: 800 L/h, コーンガス流量: 50 L/h

5. 新規色素(2)の単離精製

昨年度(平成 23 年度)の方法に従い単離精製した。すなわち, 「タマネギ色素」用のタマネギ乾燥外皮(60 g)をミルサー

で粉碎し、水(2L)を加えて5時間攪拌したのち、ブフナー漏斗を用いて濾過した。得られた抽出液に塩酸を加えてpH0.5にしたのち、酢酸エチルを加えて二層分配を行った。赤色色素を抽出した酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水して減圧で乾固した後、酢酸エチルに再溶解し、酢酸エチルで安定化させたシリカゲルカラムに負荷した。酢酸エチルで溶出したのち、色素成分を酢酸エチル/メタノール(3:7)で溶出した。色素画分を減圧乾固した。残留物を50%メタノールに溶解した後、以下の2つ条件を用いてHPLC分取を行った。

HPLC 条件①

カラム: Cosmosil Cholester (10 x 250 mm, nacalai tesque 製): 移動相 A: 0.05%TFA 入り水. B: 0.05% TFA 入りアセトニトリル, グラジエント条件: B 移動相 40-55% for 15 min, 流量: 2ml/min, カラム温度: 40 °C, 検出: 500nm

HPLC 条件②(最終精製)

カラム: Cosmosil 5PBB-R (4.6 x 250 mm, nacalai tesque 製): 移動相 A: 0.05%TFA 入り水. B: 0.05% TFA 入りアセトニトリル, グラジエント条件: B 移動相 30-37.5% for 15 min, 流量: 1ml/min, カラム温度: 40 °C, 検出: 500nm

色素 2 は酸性水溶液中で分解しやすいため、分取したピークは水/酢酸エチルの2層の三角フラスコに分取した。酢酸エチル層(色素粗画分)は無水硫酸ナトリウムによる脱水操作ののち減圧乾固した。最終的に色素(2)を赤色固形物として0.38 mg 得た。

6. 新規色素(2)の構造決定

新規色素(2)を、DMSO-*d*₆/TFA(9:1)を溶媒として、NMR 分析した。1次元測定(¹H, ¹³C) および二次元測定(¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹³C HMBC)を行った。

7. 新規色素(2)の重水素置換

新規色素(2)を D₂O/ DCI に溶解させ、90°Cの水浴中で4時間加熱後、1部をLC/ESI-MSで分析した。凍結乾燥により溶媒を除去後、DMSO-*d*₆:TFA-*d*=9:1 溶媒に再度溶解させ、¹H NMR スペクトルの測定を行った。

C. 結果および考察

新規色素(2)の精密質量の解析

市場で購入した新鮮な黄色タマネギの外皮を材料とし、その抽出液を精密質量が測定可能なUPLC/Tof-MSで分析を行った(Fig. 1)。その結果、高極性な1と共に中極性部に新規色素(2)が観測された。新規色素2は485nmに極大吸収を示した(Fig. 2)。正イオンモードのESI-MS分析で *m/z* 361, 陰イオンモードで *m/z* 359 にピークを観測した(Fig. 3)。新規色素2の正イオンモード ESI/Tof-MS による精密質量分析を行ったところ、C₁₆H₉O₁₀ (*m/z* 361.0196, Δ -1.1 mmu) と解析された。昨年度の研究から、2は1の置換体であることが明らかになっているため、1同様に正に帯電しており、正イオンモードのESI-MS分析では(M)⁺として観測されたと考えられる。よって、2の組成式はC₁₆H₉O₁₀と決定された。1の組成式との差は、炭素2分子および酸素3分子であった。これは、2が1のケトカルボン酸

置換体であるという昨年度の構造解析結果と一致した。

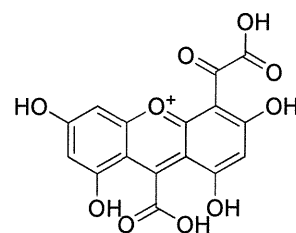
昨年度(23年度)の単離方法に則り、タマネギの外皮から新規色素(2)を単離精製した。精製した2についてNMR解析を行い、昨年解析した構造の再確認を行った。¹H-NMRスペクトル分析では、2つのダブルットシグナルおよび1つのシングレットシグナルが観測された(Fig. 4)。¹³C-NMRでは16の炭素シグナルが観測された(Fig. 5)。これらの化学シフトは昨年度単離した2の化学シフトと一致した。各種2次元NMRによる解析を行った結果(Fig. 6)、色素2は1の α -ケトカルボン酸置換体であることが確認された。構造決定の鍵とあったHMBC相関をFig. 7に示した。また化学シフトをTable 1に示した。

新規色素2は、酸性水溶液中での加熱で容易にケトカルボン酸基が脱離し、1に変換することが昨年度の研究で明らかになっている。そこで、重水素置換した溶媒中で脱離反応を起こした場合、置換位置が重水素で置換された1-dが生成することが予想された(Fig. 8)。実際に重溶媒中(D₂O/DCI)で2の加水分解を試みた結果、2は完全に消失し、1-dに変換されていることがHPLC分析で確認された(Fig. 9)。重水素置換型 cepaic acid(1-d)の分子量は290⁺であるため、正イオンモードのESI-MS分析でm/z 290、そして負イオンモードでm/z 288のイオンピークが観測されると予想された。しかしながら、LC/MS分析の結果、正イオンモードでm/z 292, 291, 294、負イオンモードでm/z 291, 290, 292にイオンピークが観測された(Fig. 10)。これは水酸基も重水

素置換したためと考えられる。このためマススペクトルによる確認は断念した。

次に1-dの¹H NMRスペクトルの測定を行った。1同様に2つのシグナルが観測された。しかしながら、高磁場側のシグナル(δ_H 6.46)が、低磁場側のシグナル(δ_H 6.60)に比べて大きく検出された(Fig. 11)。2つのシグナルの面積比は、ほぼ2:1であった。また δ_H 6.46のシグナルはダブルットとシングレットが重なった形状に観測された。これらの結果から、低磁場側の水素(δ_H 6.60)の1つが重水素で置換されていると判断された。すなわち、新規色素2の α -ケトカルボン酸は、cepaic acid(1)の δ_H 6.60に相当する水素の位置に置換していることが判明した。

Cepaic acid(1)の構造決定が行われた際、2位と4位の化学シフトの帰属はなされなかった。しかしながら、1と同じxanthylum化合物およびクエルセチン等のフラボノイド類の化学シフトを調査した結果、水素シグナルにおいては、4位が低磁場に観測され、一方炭素シグナルにおいては2位が低磁場に観測されることが判明した(Table 2)。よって、1の化学シフトは、2,7位(δ_H 6.63, δ_C 96.2)そして4,5位は(δ_H 6.46, δ_C 101.1)と帰属された。よって、2の α -ケトカルボン酸は1の4位に置換していると判断した。最終的に赤橙色の新規色素(2)の構造は4-ketocarboxyl cepaic acidと決定された。



2

ケトカルボン酸が接続したフロログルシノール(2,4,6-trihydroxyphenylglyoxylic

acid)は、クエルセチンの酸化分解物の 1 つとして報告されている。そのため、2 も、外皮中の黄色色素がクエルセチンの酸化分解物から形成されるという仮説に一致する。またタマネギ外皮の色素は、2 のような *cepaic acid* の類縁体の集合体ではないかと推測された。

D. 総括

タマネギの乾燥外皮から、赤橙色の新規色素 2 を単離精製し構造決定した。精密質量解析および重水素置換体の NMR 分析の結果、新規色素は *cepaic acid* の 4 位にケトカルボン酸が置換した構造であると決定された。本構造は色素の吸収波長および色素形成の観点からも支持されるものであり、タマネギ外皮中の色素成分は *cepaic acid* の置換体によって形成されていることを示唆した。

E. 参考文献

- 1) Yusai Ito, Naoki Sugimoto, Takumi Akiyama, Takeshi Yamazaki, Kenichi Tanamoto "Cepaic acid, a novel yellow xanthylum pigment from the dried outer scales of yellow onion *Allium cepa*" *Tetrahedron Letters*, 50, 4084-4086(2009).

F. 研究発表

1. 論文発表

Ito Y., Ishizuki K., Sekiguchi W., Tada A., Akiyama T., Sato K., Yamazaki T., Akiyama H. The analysis of residual solvents in annatto extracts using a static headspace gas chromatography method. *Am. J. Anal.*

Chem. 3, 638-645 (2012).

2. 学会発表 1件

- 1) 伊藤裕才, 坂本祐実, 杉本直樹, 穠山浩「赤タマネギ外皮に黄色色素は含まれているのか？」日本農芸化学 2013 大会 (仙台), 2013 年 3 月, 口頭発表

onion_freshskin25MeOHextract_watetr120620_1

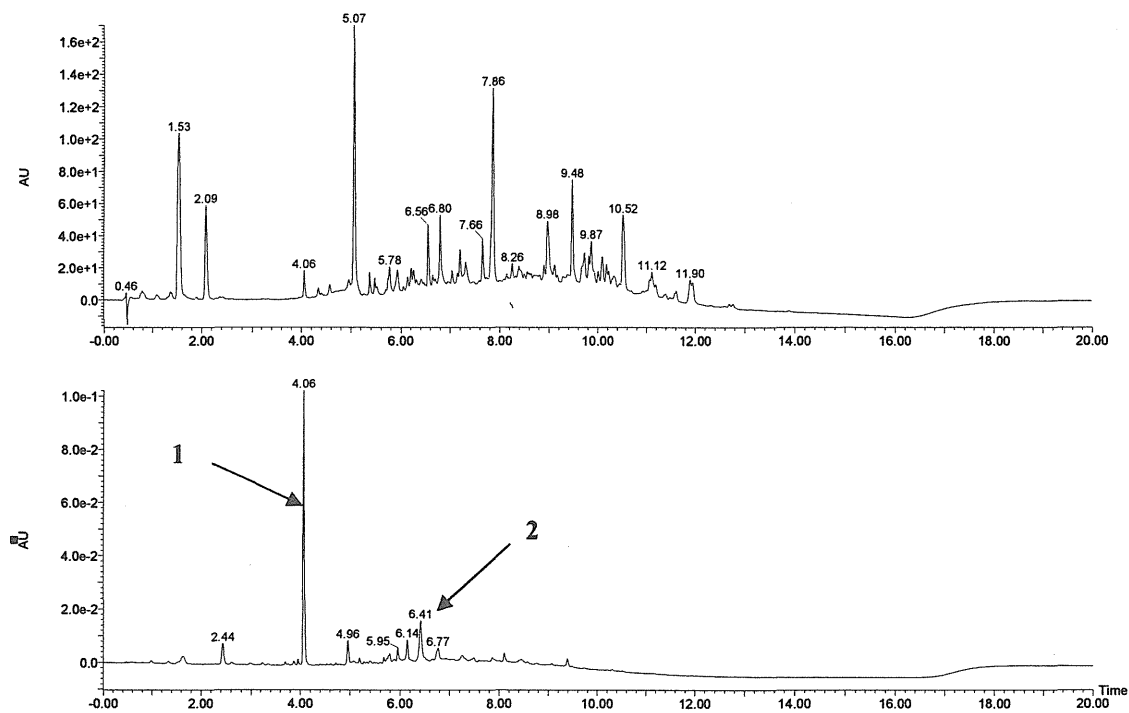


Fig. 1 タマネギ外皮抽出物の UPLC チャート図。検出波長 (210nm, 上), (450 nm, 下)

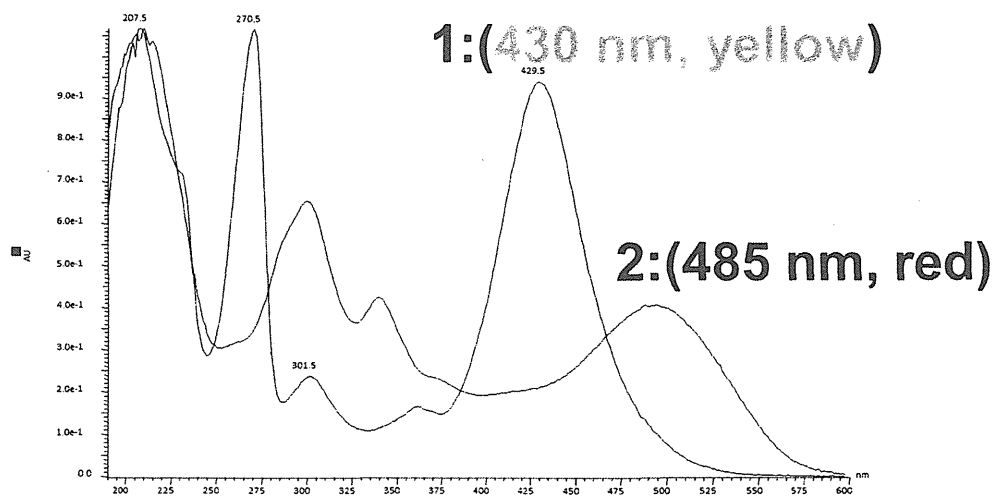


Fig. 2 新規色素(2)および cepaic acid (1)の紫外可視吸収スペクトル

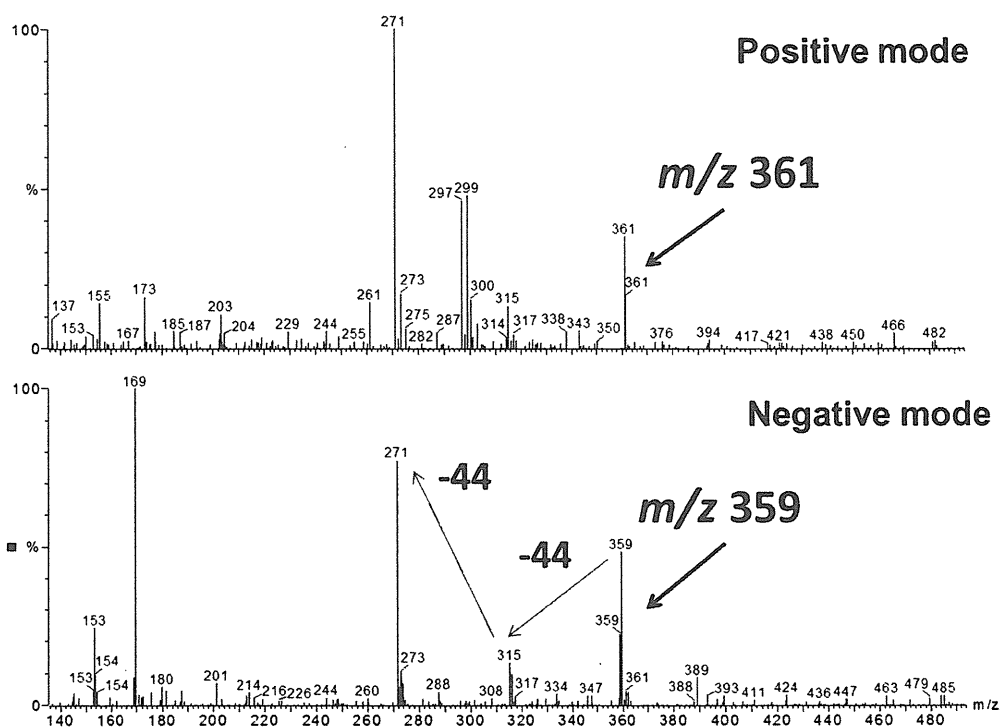


Fig. 3 新規色素(2)の ESI-MS スペクトル(上：正イオン，下：陰イオン)

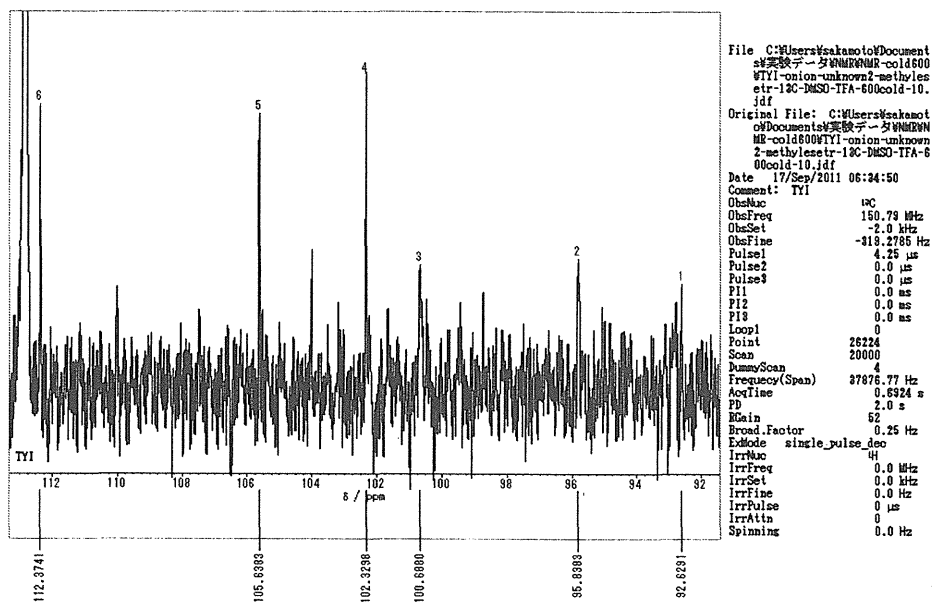


Fig. 5-a 新規色素(2)の ^{13}C NMR スペクトル(DMSO- d_6 /TFA(9:1))

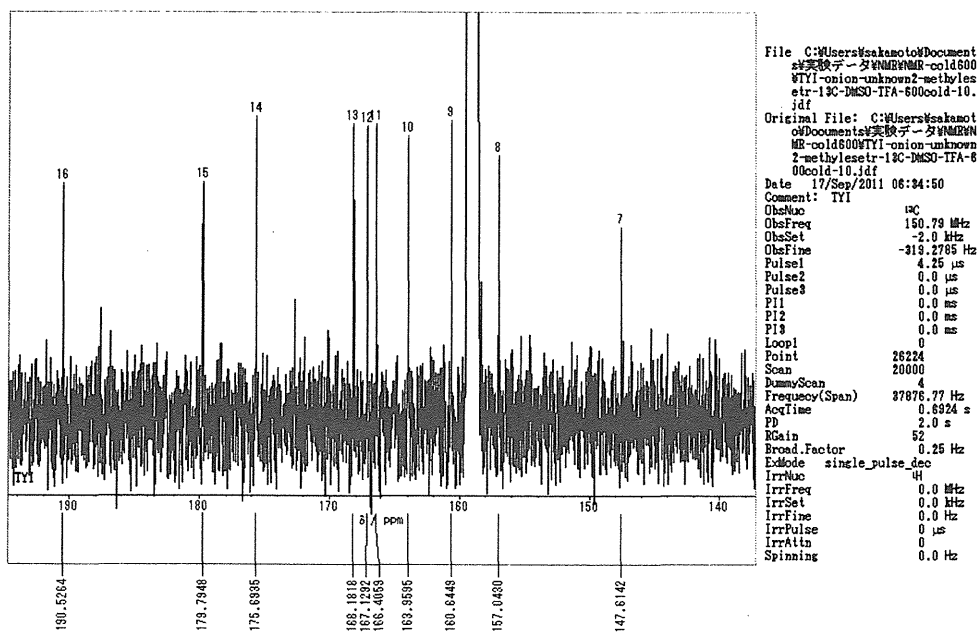


Fig. 5-b 新規色素(2)の ^{13}C NMR スペクトル(DMSO- d_6 /TFA(9:1))

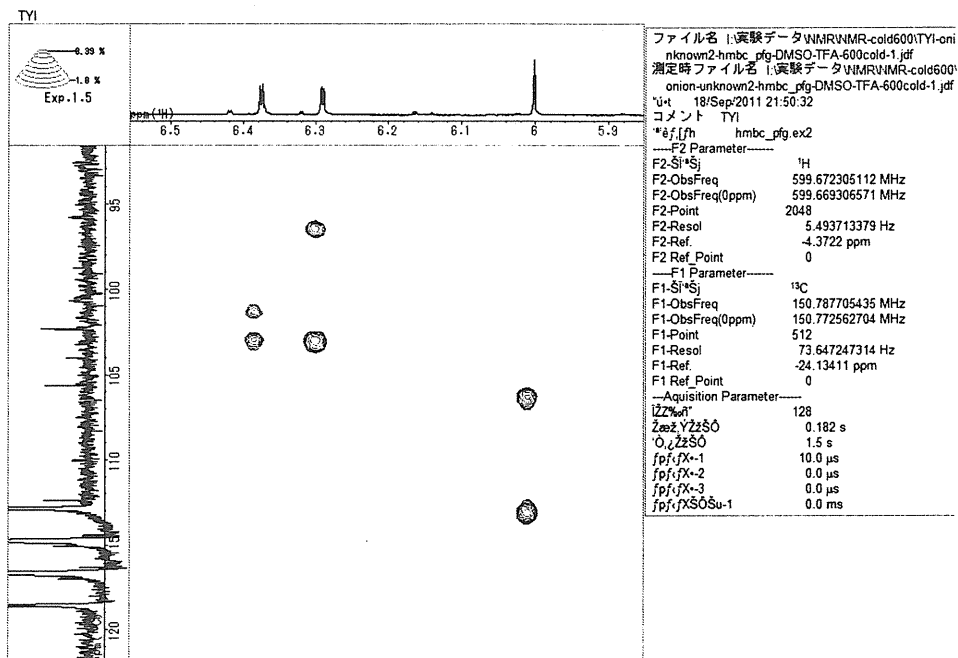


Fig. 6-a 新規色素(2)の HMBC スペクトル (DMSO- d_6 /TFA(9:1))

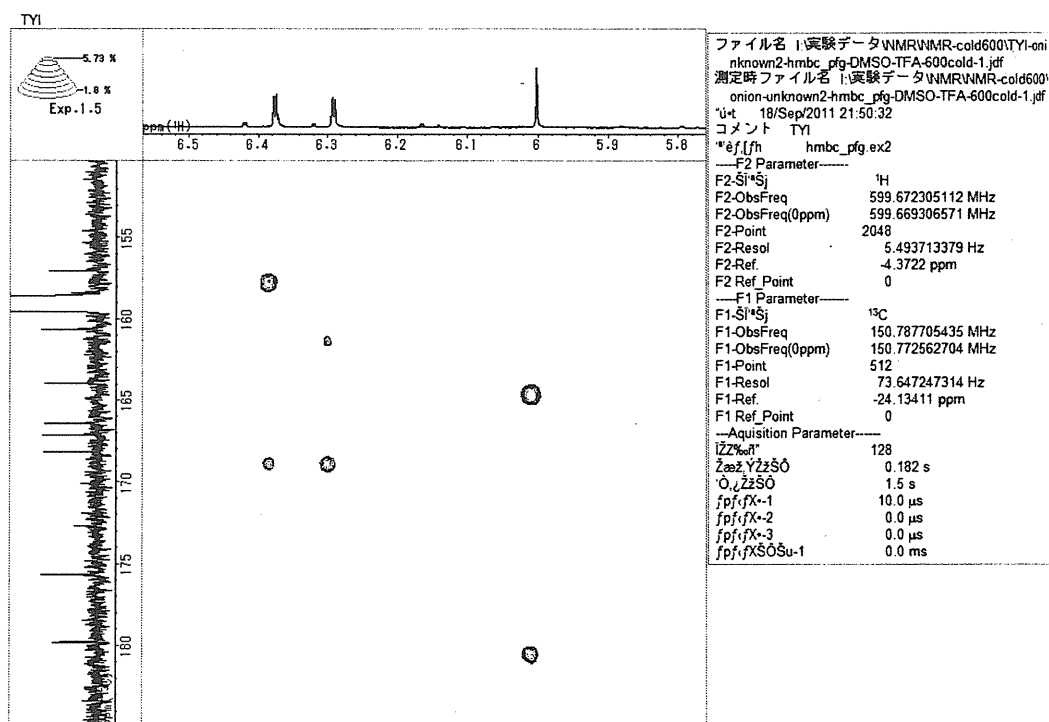


Fig. 6-b 新規色素(2)の HMBC スペクトル (DMSO- d_6 /TFA(9:1))

Table 1. Chemical shifts of **2** in DMSO-*d*₆/TFA

position	δ_{H}	J (Hz)	δ_{C}	HMBC correlations
1			164.0	
2	6.00	s	92.6	C-1, C-2, C-3, C-4, C-9a
3			179.8	
4			105.6	
4a			175.7	
5	6.29	d, 2.2	100.7	C-5, C-6, C-7, C-8a, C-10a
6			168.2	
7	6.37	d, 2.3	95.8	C-5, C-6, C-7, C-8a, C-8a
8			157.0	
8a			102.3	
9			147.6	
9a			112.4	
10a			160.6	
11			166.4	
1'			190.5	
2'			167.1	

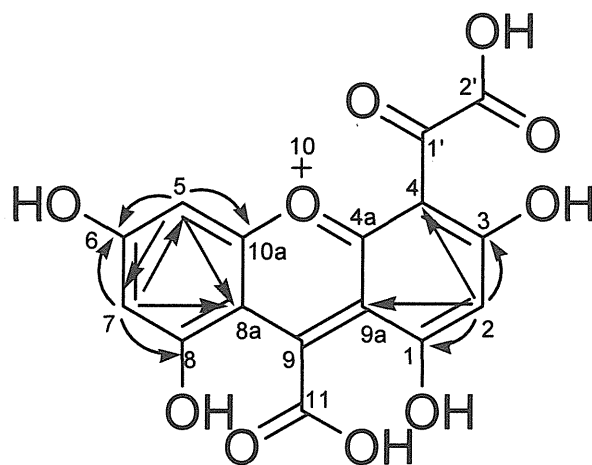


Fig. 7 新規色素 **2** の ^1H - ^{13}C HMBC 相関 (矢印)

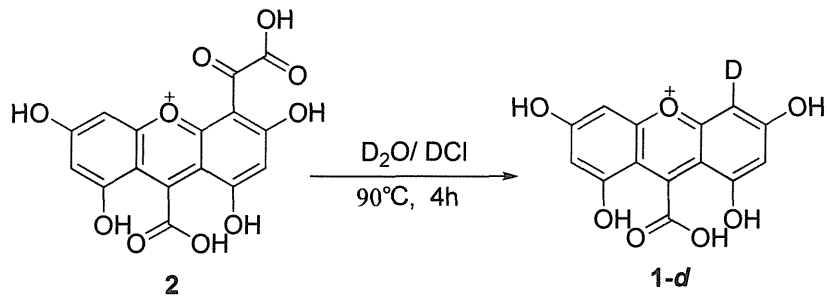


Fig. 8 新規色素(2)の重水素置換 cepaic acid (1-d)への返還

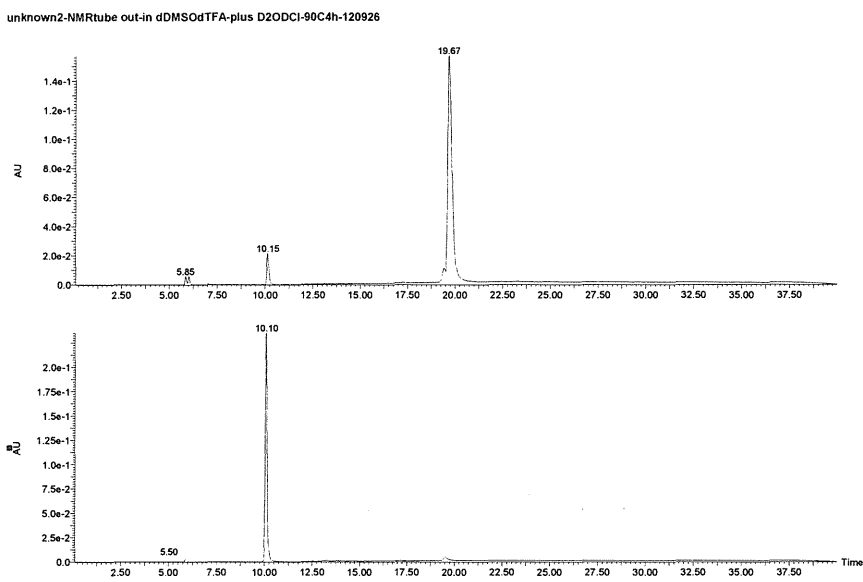


Fig. 9 HPLCによる新規色素(2:上)から1-d(下)への返還の確認(検出450nm)

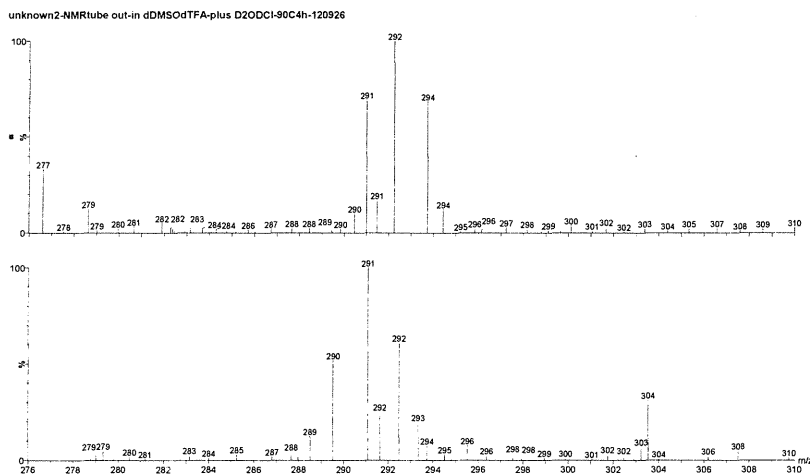


Fig. 10 1-dのESI-MSスペクトル(上:正イオン, 下:陰イオン)

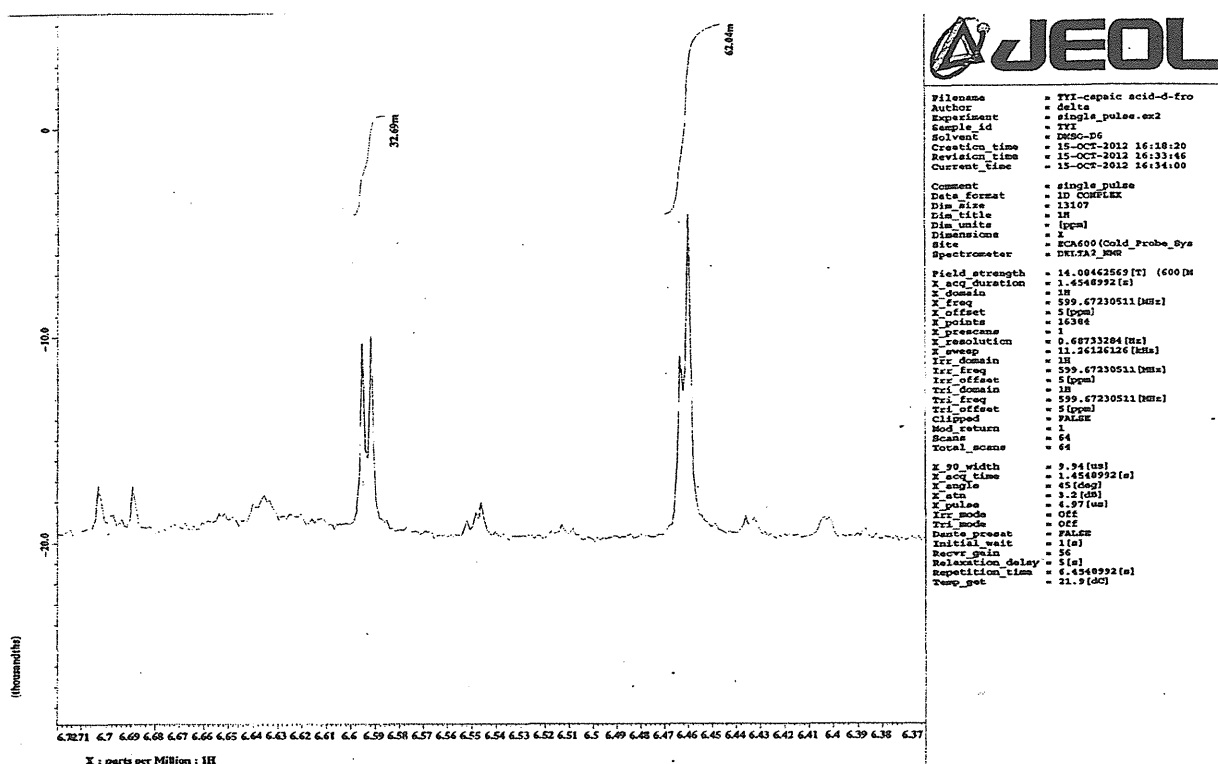


Fig. 11 重水素置換 cepaic acid (1-d)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(DMSO- d_6 /TFA(9:1))

Table 2 : xanthylum 化合物およびフラボノイド,
アントシアニンにおける 6,8 位の化学シフト

		position	
		6(4a)	8(6)
xanthylum salt (NJ4)	$\delta_{1\text{H}}$	—	6.9
	$\delta_{13\text{C}}$	107.9	95.6
quercetin	$\delta_{1\text{H}}$	6.17	6.37
	$\delta_{13\text{C}}$	99.3	94.4
cyanidin-3-glucoside	$\delta_{1\text{H}}$	6.74	6.95
	$\delta_{13\text{C}}$	102.5	94.2

* xanthylum salt の時のみ position は 4a と 6