

琉球大学学術リポジトリ

ブッソウゲ花冠のアントシアニン色素(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 外間, 宏一, 仲宗根, 洋子, 砂川, 美智子, Hokama, Koichi, Nakasone, Yoko, Sunagawa, Michiko メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4301

ブッソウゲ花冠のアントシアニン色素

外間 宏一* 仲宗根 洋子* 砂川 美智子*

Koichi HOKAMA, Yoko NAKASONE and Michiko SUNAGAWA :
Anthocyanin pigments from the corolla of *Hibiscus Rosa-Sinensis L*

I 緒 言

ブッソウゲ (*Hibiscus Rosa-Sinensis L*) は熱帯地方に広く分布しており、沖縄では、家の周囲によく見受けられ、年中赤い花を咲かせていることから、アカバナと呼ばれて親しまれている。このブッソウゲ花冠の色素抽出液は、酸性溶液で赤色、アルカリ溶液で青色を足し、酢酸鉛溶液を加えると青色の沈澱を生ずることにより、アントシアニン色素を含んでいることがわかった。⁵⁾

アントシアニン色素は植物の花弁、果実、葉、茎または根などに含まれている天然色素配糖体の一群で、赤、紫、青などの鮮やかな発色をしている。ダリア、バラなど、種々の花のアントシアニン色素についての研究報告は数多くなされているが、⁵⁾ ブッソウゲ花冠の色素についてはあまりなされていない。

本研究において、ブッソウゲ花冠の色素の抽出、分離、精製を行ない、ブッソウゲ色素のアグリコンを可視部吸収、赤外吸収スペクトル及びペパークロマトグラフィーにより検討した結果、ブッソウゲ色素の化学構造について若干の知見を得たので報告する。

II 実験方法

1. 試料の調製

ブッソウゲ花冠を1%塩酸メタノール溶液で一夜冷浸後、ろ過し、残渣はさらに1%塩酸メタノール溶液で再抽出を行なった。これらの抽出液を室温で1/50に減圧濃縮し、濃縮物に少量の水を加え、黄褐色の油状の沈澱物をろ別し、液にメタノール飽和の塩基性酢酸鉛を攪拌しながら徐々に添加した。⁶⁾ 最初に得られる白色の沈澱物をろ別し、ろ液にさらにメタノール飽和の塩基性酢酸鉛を加えると、暗青色の沈澱が生じた。遠心分離 (3000 r.p.m., 10 min.) 後、沈澱物は酢酸で溶解、再び遠心分離 (3000 r.p.m., 30 min.) し、上澄液をスポイドで静かにとり、これに、3~5倍容量のエーテルを加えると暗褐色の沈澱が生じた。沈澱物は0.1%塩酸メタノール溶液に溶解し、7~8倍容量のエーテルを加えると、赤褐色の沈澱が生じた。遠心分離後、沈澱物は真空乾燥 (40°C, 8時間) し、デシケーター中に保存した。

2. 色素の分離、精製⁶⁾

上記のようにして得られた試料を少量の酢酸-塩酸-水 (15:3:82) に溶解し、同一溶媒でポリアミドによるカラムクロマトグラフィーを行なった。溶離液は室温で減圧濃縮後、東洋ろ紙No.50の原点に

* 琉球大学農学部農芸化学科
琉球大学農学部学術報告 23: 221~229 (1976)

帯状に塗布し、酢酸-塩酸-水 (5:1:5) を用いて一次元上昇法により展開した。ペーパークロマトグラム上、最も高濃度のスポット部分を切り取り、0.1%塩酸メタノールで抽出した。抽出液は濃縮して再び東洋ろ紙No50に塗布し、80%ギ酸-塩酸-水 (5:2:3) を用いて上記同様に色素を分離、精製した。色素は0.1%塩酸メタノールで抽出し、抽出液に7~8倍量のエーテルを加えると、赤褐色の沈澱が析出した。沈澱物は遠心分離 (3000 *r.p.m.*, 10 *min.*) 後、少量のエタノールに溶解し、7~8倍容量のエーテルを加えた。析出してきた沈澱物は0.1%塩酸メタノールに溶解し、真空乾燥後可視部及び赤外吸収スペクトル測定、部分酸加水分解、ペーパークロマトグラフィーの試料とした。

3. ブッソウゲ色素よりアグリコン及び糖の分離

2項で得られた試料に6N塩酸を加え、100°C、20分間、湯浴上で加水分解を行なった。冷却後、少量のイソアミルアルコールと等量の水を加え、アグリコンをイソアミルアルコール層に、糖を水層に転溶させた。アグリコンを分離するために、イソアミルアルコール層を減圧濃縮して、酢酸-塩酸-水 (15:3:82) を溶媒とするセルローズカラムクロマトグラフィーに付した。アグリコン色素は0.1%塩酸メタノールで溶離し、減圧濃縮後、東洋ろ紙No50を用い、酢酸-塩酸-水 (5:1:5) によるペーパークロマトグラフィーを行なった。ペーパークロマトグラム上、最も高濃度の色素部分を切り取り、0.1%塩酸メタノールで抽出した。抽出液は赤紫色を呈し、真空乾燥後、可視及び赤外吸収スペクトル測定、ペーパークロマトグラフィーの試料とした。

糖を含む水層は、酸化銀 (アンモニア水に溶解) で中和後²⁾、日立高速遠心機 (18PR-3型) で遠心分離 (9000 *r.p.m.*, 20 *min.*) を行なった。上澄液をとり、45°Cで減圧濃縮後、アンバーライト1R-45、アンバーライトCG-120のカラムに通し脱塩を行なった。カラムの約20倍容量の水で糖を溶離し、溶離液は45°Cで減圧濃縮を行ない、ペーパークロマトグラフィーの試料とした。

4. 可視部吸収スペクトルの測定¹⁾

2及び3項で得られたブッソウゲ色素およびそのアグリコンは、0.01%塩酸メタノールに溶解し、ベックマ自記分光光度計で測定した。また5%塩化アルミニウムエタノール溶液を2~3滴加え、シフトの状況を調べた。

5. 赤外吸収スペクトルの測定

ブッソウゲ色素およびそのアグリコンは、KBr錠剤を用い、日立赤外分光光度計で測定した。

6. 糖のペーパークロマトグラフィー

3項で得られた糖フラクションは、東洋ろ紙No50を用い、*n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5) *n*-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3) 及びフェノール-水 (5:1) を展開剤としてペーパークロマトグラフィーを行なった。標品としてグルコース、フルクトース、アラビノース、ラムノース、シュークロース及びガラクトースを用いた。

7. 部分酸加水分解⁶⁾

2項で得た少量のブッソウゲ色素に1N塩酸を加え、90°Cの湯浴上で部分加水分解を行なった。一定時間毎にその少量をとり、東洋ろ紙No50の一端にスポットしていき、酢酸-塩酸-水 (15:3:82)、*n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5) を溶媒としてペーパークロマトグラフィーを行なった。

8. クワの実より分離したペチュニジンとブッソウゲ色素のアグリコンの比較

桑の実の色素には、シアニジン-3-グルコシド、ペラルゴニジン-3-グルコシド及びペチュニジン-3-ルチノシドの3種類が存在することが牧らによって報告されている。³⁾

桑の実を1%塩酸メタノール溶液に浸漬、抽出液は室温で減圧濃縮後、東洋ろ紙No.50の原点に帯状に塗布、酢酸-塩酸-水(15:3:82)で展開を行なった。R_f 0.3, 0.5の2種類の色素が検出された。R_f 0.5の部分を取り、0.1%塩酸メタノール溶液で抽出した。抽出液は、酢酸-塩酸-水(5:1:5)及び80%ギ酸-塩酸-水(5:2:3)を溶媒としてペーパークロマトグラフィーを行なった。この色素の極大吸収は535 nmにあることから、ペチュニジン-3-ルチノイドであろうと推定される。3項の方法でこの色素を加水分解することにより、アグリコンとしてペチュニジンをうる。ブッソウゲ色素のアグリコンと極大吸収、酢酸-塩酸-水(15:3:82)及び80%ギ酸-塩酸-水(5:2:3)を溶媒としたペーパークロマトグラム上のR_f値をそれぞれ比較検討した。

III 実験結果及び考察

1. 可視吸収スペクトルの測定

ブッソウゲ色素は530 nmに、そのアグリコンは543 nmにそれぞれ極大吸収を示した。5%塩化アルミニウムエタノール溶液を2~3滴加えると、ブッソウゲ色素の極大吸収は530 nmより554 nmへそれぞれシフトすることがみられた(図1, 図2)。

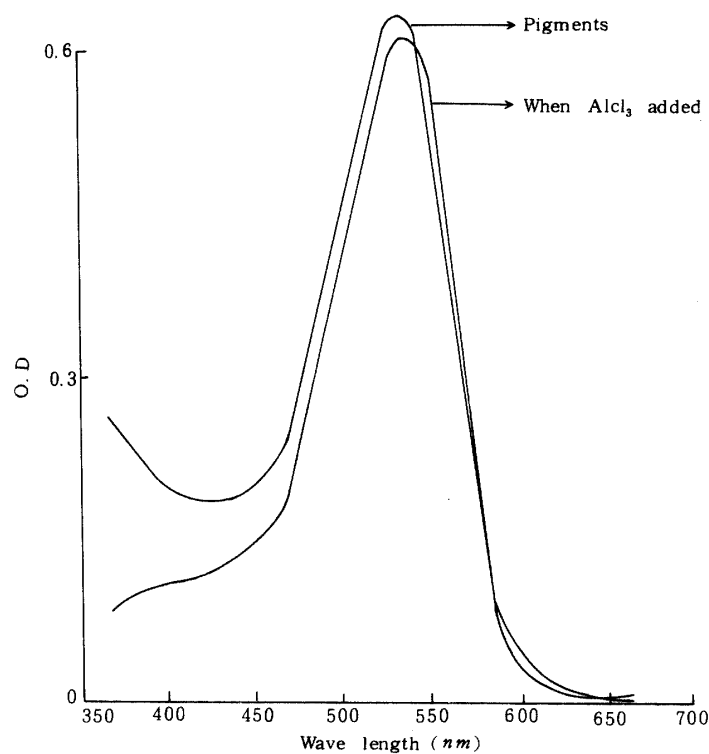


Fig. 1. Visible spectra of anthocyanin from hibiscus

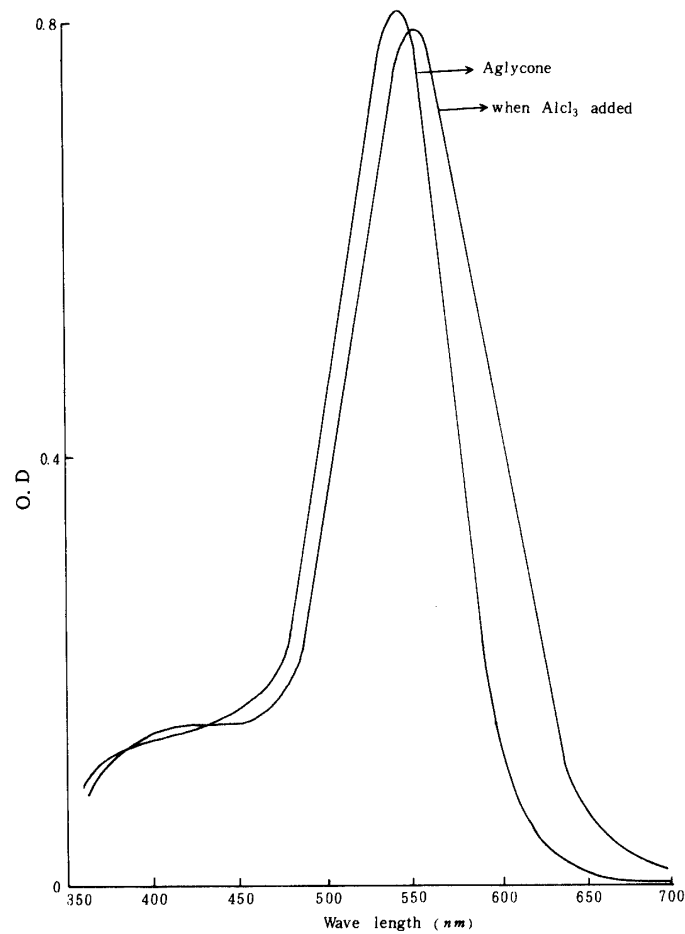


Fig. 2. Visible spectra of aglycone from hibiscus

表 1 に、これらの極大吸収を Harbone の値¹⁾と比較したものを示す。Harbone の値にブッソウゲ色素と近い値は見い出せなかったが、アグリコンは、ディルフィニジン、マルビジン、ペチュニジンの極大吸収と同じような値を示した。しかし、塩化アルミニウムによるシフトの状況より、マルビジンではないことがわかった。

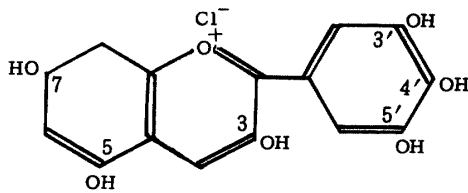
Table 1. Maximum absorption spectra of pigments from hibiscus corolla and other related pigments

Pigments	Maximum absorption spectra (nm)	Shift by AlCl ₃ addition
Glycoside of hibiscus	530	+
Its aglycone	543	+
Delphenidin	544*	+*
Petunidin	543*	+*
Malvidin	542*	-*

* Data described by Harbone

2. 赤外吸収スペクトルの測定⁴⁾

図3, 4はそれぞれブツウゲ色素, そのアグリコンの赤外吸収スペクトルである。いずれの場合にも, ポリフェノール性水酸基の幅広い吸収が 3100 cm^{-1} にみられ, 1635 cm^{-1} , 1498 cm^{-1} 付近の吸収はベンゼン縮合環によるものと思われる。1000~1350 cm^{-1} の間にみられるピークはフェノール性水酸基のC-O伸縮振動吸収であろう。色素配糖体はアグリコンと比較して 1078 cm^{-1} 付近に強い吸収がみられるが, これはエーテル型酸素および各水酸基のC-O伸縮振動が複雑にあらわれたものと思われる。また, メトキシル基の吸収は 2800 cm^{-1} 付近にあらわれるが, いずれにもその吸収は認められない。したがって, アグリコンは1項でのべたデルフィニジン, マルビジン, ペチュニジンのうち, メトキシル基をもたないデルフィニジンであろうと推定される。上記3化合物の化学構造式を下記に示す。⁵⁾



Delphinidin
 Petunidin (3' - methyl ether)
 Malvidin (3' : 5' - dimethyl ether)

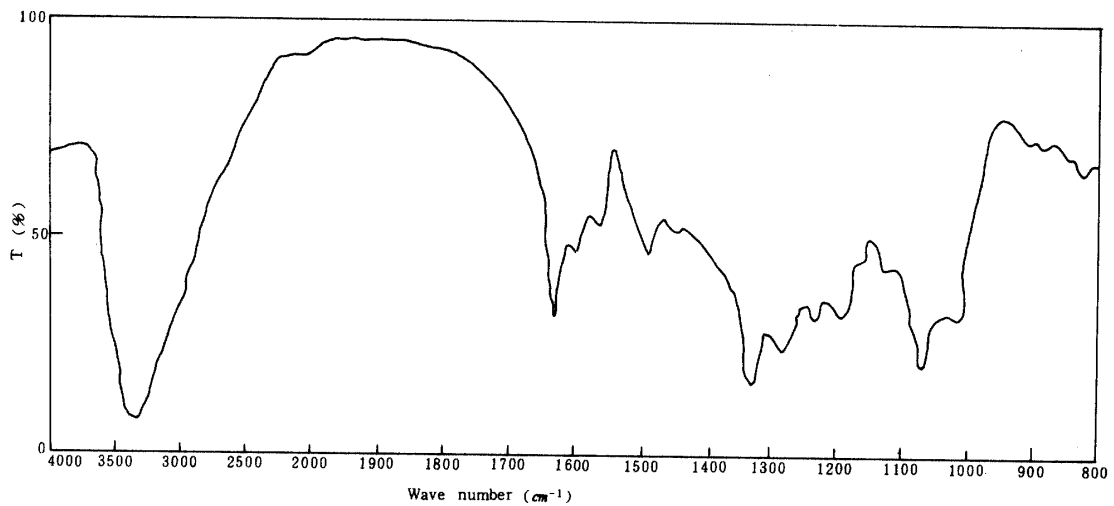


Fig. 3. IR spectra of anthocyanin from hibiscus (KBr)

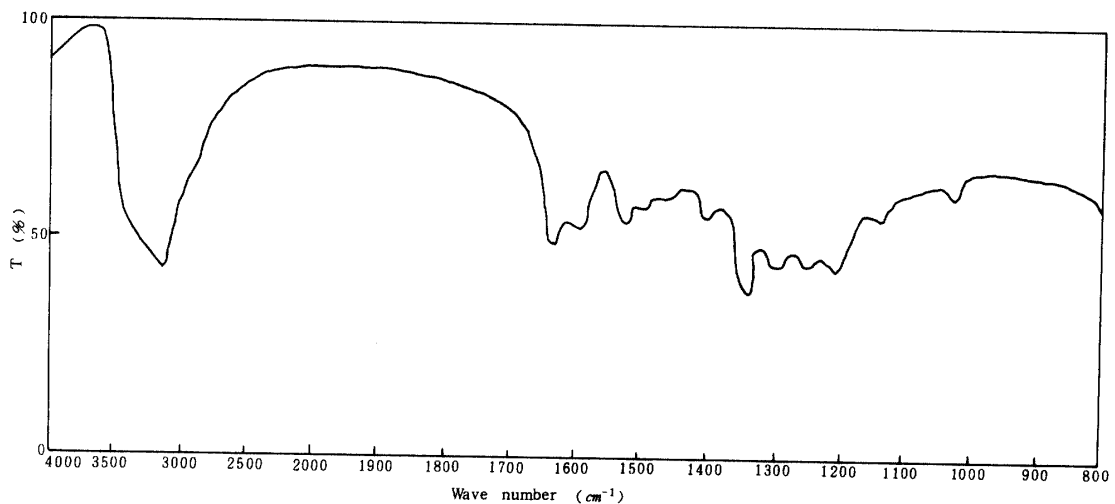


Fig. 4. IR spectra of aglycone from hibiscus (KBr)

3. 糖のペーパークロマトグラフィ

表2は標品及び試料の糖R_f値を示したものである。II 3項の方法による色素加水分解物からは、グルコース、フルクトースのR_f値に一致する2種類の糖が検出された。

Table 2. R_f values in sugar paper chromatogram when visualized by aniline hydrogen phthalate

Sugar \ Solvent	<i>n</i> -BuOH - AcOH - H ₂ O (4 : 1 : 5) Descending	<i>n</i> -BuOH - Pyridine - H ₂ O (6 : 4 : 5) Ascending	Phenol - H ₂ O (5 : 1) Ascending
Glucose	0.24	0.48	0.26
Fructose	0.30	0.43	0.28
Arabinose	0.32	0.50	0.30
Galactose	0.21	—	0.32
Rhamnose	0.49	—	0.47
Sucrose	0.18	0.31	0.21
A*	0.25	0.48	0.26
B*	0.30	0.43	0.28

* Sugars A and B are hydrolyzates from hibiscus pigments.

4. 部分酸加水分解

図5および図6が示すように、それぞれ2スポット (R_f 0.43, 0.3 ; R_f 0.51, 0.40) の中間配糖体が検出されたことから、ブッソウゲ色素配糖体の結合糖に2種あることが考えられる。*n*-ブタノール-酢酸-水 (4 : 1 : 5) を用いて上昇法により展開したときは、色素と糖のR_f値が一致して糖の検出が困難であったが、下降法により展開したときは、色素と糖の分離がよく、前述の如く、2種の糖が検出された。これは中間配糖体が2種あることと一致する。なお酢酸-塩酸-水 (15 : 3 : 82) では上昇法、下降法いずれの場合にも、糖は溶媒とともに上昇するために、糖の分離同定はできなかった。

分解は3段階で進行することが認められた。即ち、(1) 1 N 塩酸処理後10時間目頃から分解が起り始め、色素配糖体、アグリコン、2種の中間体の4物質が30時間目頃まで同時に存在する状態が続いた。(2) 更に30時間ほど経過すると色素配糖体は完全に分解消失し、120時間目頃まで2種の中間体とアグリコンの3化合物が同時に存在した。(3) 150時間目頃になると中間体のうち1つは消失し、他の1つの中間体とアグリコンは180時間目頃まで同時に存在した。200時間目頃になると1つの中間体も消失して、遂に単一のアグリコンだけになった。

図5でのR_f 0.43の中間体は、非常に認めにくかったが、R_f 0.30の中間体は、色調がかなり鮮明であったので、この部分を切り取り、極大吸収を測定した。

その結果、535 nmに極大吸収を持つことがわかった。これは、Harborneの測定したディルフィニジン-3-β-グルコシドの極大吸収と一致するが、なお検討を要する。

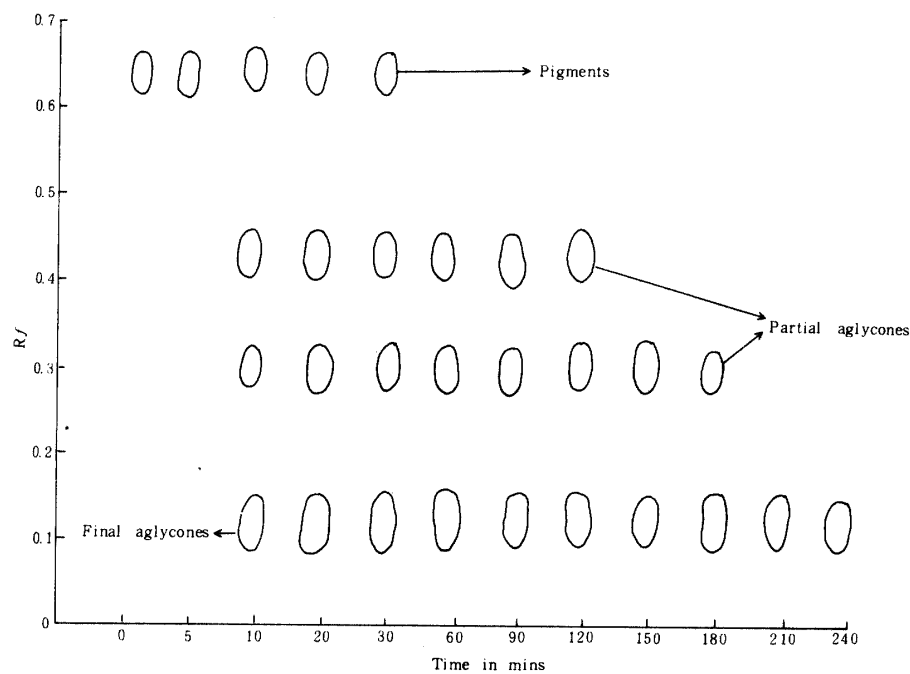


Fig. 5. Paperchromatogram of partial acid hydrolyzates from hibiscus pigments (ascending)

Solvent system : AcOH-HCl-H₂O (15 : 3 : 82)

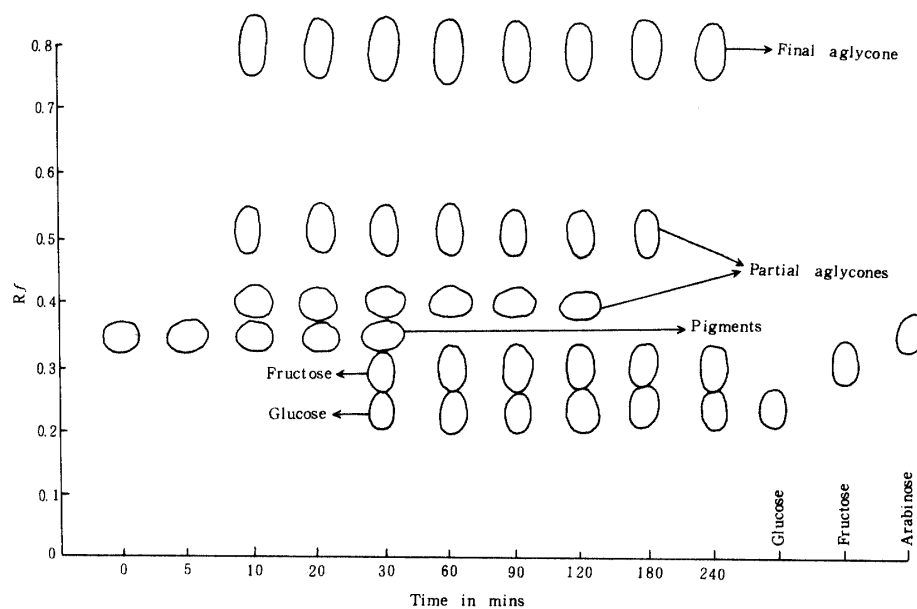


Fig. 6. Paper chromatogram of aglycone and sugar components after partial acid hydrolysis of hibiscus pigments (descending)

Solvent system : *n*-BnOH-AcOH-H₂O (4 : 1 : 5)

Coloring reagent : Aniline hydrogen phthalate

5. 桑の実ペチュニジンとブッソウゲ色素の比較

ブッソウゲ色素のアグリコンは桑の実のペチュニジンとはほぼ同様な極大吸収を示したが、ペーパークロマトグラフィーのR_f値は一致しなかった(図7, 表3)。このことよりも、ブッソウゲ色素のアグリコンはペチュニジンではないと思われる。

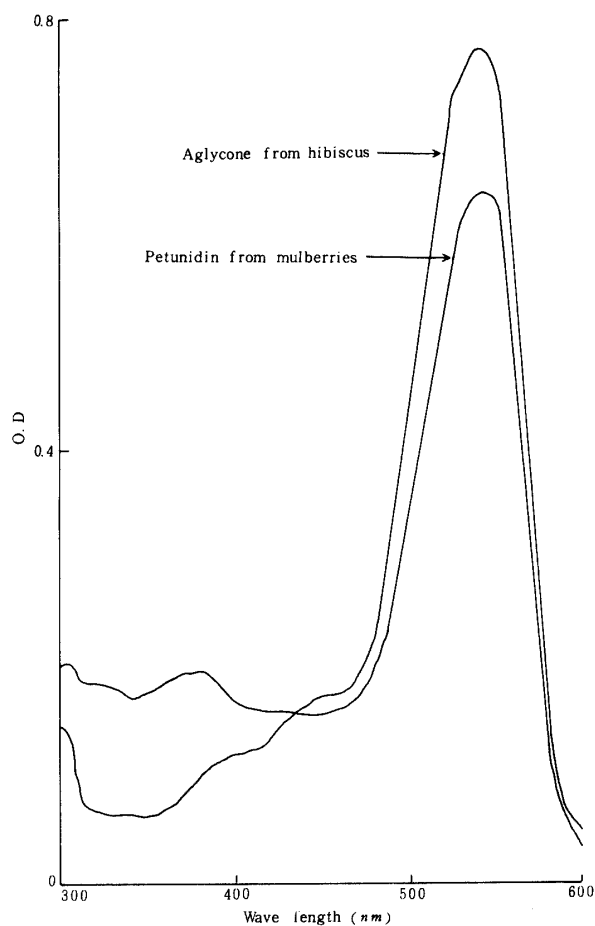


Fig. 7. Visible spectra of aglycone from hibiscus and petunidin from mulberries

Table 3. R_f values in paper chromatogram of pigments from hibiscus corolla and petunidin from mulberries

Pigments	Solvent			
	<i>n</i> -BuOH-AcOH-H ₂ O (4 : 1 : 5)	80% HCOOH-HCl-H ₂ O (5 : 2 : 3)	AcOH-HCl-H ₂ O (15 : 3 : 82)	AcOH-HCl-H ₂ O (5 : 1 : 5)
Pigments of hibiscus	0.29	0.85	0.64	0.81
Its aglycone	0.75	0.27	0.12	0.36
Petunidin of mulberries	—	0.24	0.09	—

6 融点測定

ブッソウゲ色素の融点ははっきりしなかったが、そのアグリコンは針状結晶で、融点は183~185°Cを示した。

IV 要 約

1. ブッソウゲ花冠の色素を1%塩酸メタノール溶液で抽出し、ポリアミドによるカラムクロマトグラフィ、ペーパークロマトグラフィにより分離、精製を行なった。
2. ブッソウゲ色素を加水分解し、可視部吸収スペクトル、赤外吸収スペクトル及びペーパークロマトグラフィにより、検討した結果、アグリコンはデルフィニジン、結合糖はグルコースとフルクトースであろうとそれぞれ推定された。
3. 加水分解は3段階で進行することより、ブッソウゲ色素はデルフィニジンの2ヶ所に糖が結合している配糖体と考えられ、その結合位置は一般に3および5の位置であることが知られている。

謝 辞

IRスペクトル測定に際して、いろいろ便宜をはかって下さった本学教養部森巖教授に謝意を表す。

参 考 文 献

1. Harborne J. B. 1958 Spectral methods of characterizing anthocyanins, *Biochem. J.*, **70**: 22 ~ 28
2. 宮道悦男 1962 植物成分研究法, 267, 東京, 広川書店
3. 牧善輔, 稲本英子 1972 桑の実のアントシアニン色素, 京都府立大学学術報告, **23**: 1~4
4. 中西香爾 1962 赤外吸収スペクトル定性と演習, 26~41 東京 南江堂
5. 上田博之他 14名 1963 植物化学実験書 127 東京 広川書店
6. 吉倉和子, 浜口陽一 1970 黒大豆のアントシアニン色素, 栄養と食糧, **23**(6): 15~18

Summary

1. Pigments were extracted from the corolla of *Hibiscus Rosa-sinesis* L grown in Oknawa and then isolated and purified by means of poly amide column chromatography and paper chromatography.
2. From the results of the visible and IR spectra and the paper chromatography performed for the above mentioned pigments, it was suggested that the pigments would be glycoside which had delphinidin as aglycon and glucose and fructose as sugar components in the molecule, respectively.
3. From the results of three step partial acid hydrolysis, the hibiscus pigments were supposed to be glycoside in which sugar components would be combined at 3 and 5 position of delphenidin as generally well known.