

「ナスの色素研究」

富田 睦子*

緒 論

ナス (*Solanum melongena* L. Var *erculentumness*) はその味と美しい色彩とによって一般に広く料理に利用されている。その外皮中に含まれている色素についての化学的究明は非常に興味深く、古くから多くの研究対照とされていた。Kuroda & Wada は¹⁾ chemical method を使ってナスの anthocyanin の分²⁾離と同定を行い、又 Robinson G. M & Robinson. R は一般に anthocyanin の glycosidic nature について Columu & distribution metod を使い研究しているが、何れにしても、これらの方法には一定の限界がある。

Bate-Smith,³⁾ Hayashi & Abe⁴⁾ は paperpartition chromatography を駆使して純粋な, pigment を得て以来、色素の同定に関しては飛躍的な発展を就げ、⁵⁾ 又極く最近には Harborne が Spectral method によって anthocyanin 同定を試みており、かなりの成果をおさめている。

本研究に於いては、ナスの外皮中の anthocyanin を paper chromatography 及び spectro photo metry によって分離同定を試み、その PH の変化による影響を分光学的に追求し、更に sugar の position 及びその acyl-compoment に論及するものである。

Ⅱ 材料及び方法

a) 色素の分離は Kuroda & Wada の方法¹⁾によった。先ず、新鮮な茄子 9 kg の外皮をすばやくむいて、直ちに 3% -methanol-HCl に浸す。3時間浸出してその鮮紅色溶液を取り出し、飽和酢酸鉛メタノール溶液を加え、生じた白色沈殿を濾別し、更に酢酸鉛溶液を加えて沈殿する青色部分を集めて吸引し、冷水でもって十分に水洗し、陶土板上で乾燥させた。この粉末(67.5g)を 2% -methanol-HCl に浸かし、これに 3 倍容の ether を加えて黒赤紫色沈殿物を生ぜしめ、底部に沈殿している部分を遠心分離機にかけて乾燥する (725mg)。更にこの粉末を 2% methanol-HCl に溶かし、ether

を加えて沈殿させた。このような操作を 2 回繰返し、680 mg の crude anthocyanin を得た。

b) Single anthocyanin の分離

Column chromatography を用いて Single anthocyanin を分離した。溶媒は、B. A. W. [n-butanol-acetic acid-H₂O (4 : 1 : 5) v/v/v] を使用した。

Crude anthocyanin から single anthocyanin を得るには cellulose powder (東洋濾紙会社製品), mesh 100~200 を溶媒に懸濁させ、吸着管 (3.4×30) に除々に詰め、その上に crude anthocyanin 54.4mg を脱イオン水 20cc に溶かし Cellulose powder と混合したものをのせ、溶媒を注いで Column に生じた吸着帯を流出させ分割採取し、波長 546mu の吸光度を測定し、volume に対して plot⁶⁾した。又各成分を第一次元 paper chromatography にかけてみた。この溶媒は、BAW, 1% HCl [H₂O-12N hydrochloric acid (97 : 3v/v/v)], BuHCl [n-Butanol-2 N hydro chloric acid (1 : 1 v/v/v)], を用いた。但し BAW, BuHCl の展開時間は 17~18 時間であり、1% HCl は 4 時間であった。濾紙は東洋濾紙 No. 50 2×40cm を使用し、その一端に成分を毛細管で付け、各種溶媒にて展開させ、飽和中性酢酸鉛にて発色せしめた。分離した anthocyanin の純度については paper chromatography で一個の spot を、及び spectrophotometry で特有の波長を示すことにより判定した。以後 anthocyanin と云えば single anthocyanin のことを指す。

c) Spetrophotometry

島津分光光度計 QR~50 型を使って 650-250m μ の範囲で測定した。試料は Crude anthocyanin 及び Column chromatography で分離した single anthocyanin であり、前者の測定には BAW 及び 燐酸緩衝液 (PH 3.7.6.4.7.8) に溶解したもの、後者に対しては吸光度 1.0~0.2 を示す様に適当に BAW で稀釈して測定した。

d) 呈色反応

* 昭和36年度本学卒業生

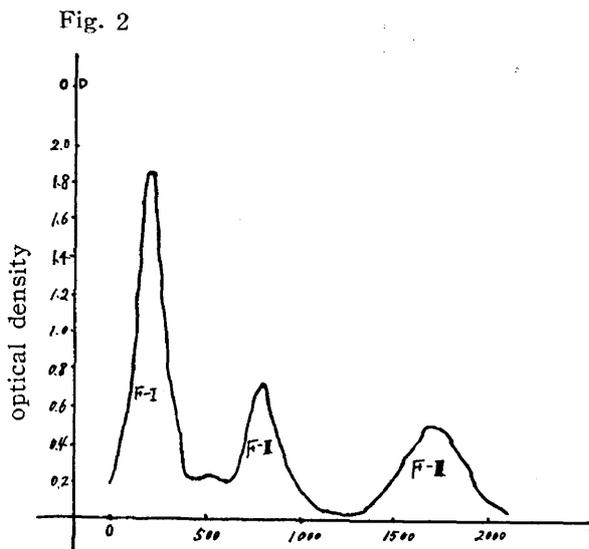
Crude anthocyanin 及び Simple anthocyaninを 磷酸緩衝液によってpHの変化, アルコール溶液に酢酸ソーダ, 及び炭酸ソーダを加えた混液, 塩化第二鉄, Fehling溶液に対する色調の変化を調べた。

e) anthocyanidin

anthocyanin の aglucone である anthocyanidin は塩酸で加水分解し得た。即ち anthocyanin 0.2gを 丸底フラスコにて 20% HCl 60ml で 3 分間地下火で 激しく煮沸し (赤銅色沈殿物析出してきた), 冷却後沈殿物を濾別し, 20% HCl で洗い乾燥すると 31mg の anthocyanidin を得た。

III 結果及び考察

Crude anthocyaninを Fig 1 の様なColumn chromatography に適要することによって, 流出した Fraction を分割採取し波長546m μ でそれぞれについて吸光度を測定したものが Fig 2 であり, 初めに流出し



たものから順に Fraction I, II, III と名付けた。Fraction I は溶媒400ml, Fraction II は 1000ml, Fraction III は 2000ml で流出する。この様な結果から Fraction I は約全体の 42%, Fraction II は 28%, Fraction III は30%であることが分った。

次にCrude anthocyanin I, II, IIIについて pH の変化, アルコール溶液に酢酸ソーダ, 及び炭酸ソーダを加えた混液, 塩化第二鉄, フェーリング溶液を与えてその色調変化を検討したのが Table I に示した。この結果からも明らかな様に, anthocyan 色素は pH によってその色調を変化し, 酸性では赤色, アルカリ性では青色を示す。又有機酸, 金属イオンによってもその色調を変えることが明らかとなった。酢酸ソーダ, 炭酸ソーダ, Fehling 溶液に対しては添加直後の色調はしばらくすると褐色に変わった。従来, 色彩を異にする植物から色素を抽出してみると, しばしば同色素を得ることを考え合わせると, 花色の発現には色素部分即ち aglucone に結合する糖の性状のみならず, 植物体自体の示す内部環境要因が複雑にからみあっているものと考えられる。1916年 R. Willstätter & E, H, Zollinger が花色変異の原因をすべて細胞液中の pH によって決定づけようとしたが, 柴田桂太, 柴田雄次, 柏木は, 細胞液中の anthocyanin と金属塩類との錯塩形成に求めた。一方 G. M. Robinson, & R. Robinson も anthocyanin 自体の変化, 即ち anthocyanin と金属塩類と弱い結合状態にある化合物を推定している。アニリン黄を例にとってみるとアゾベンゼン (C₆H₅N=NC₆H₅) でアゾ基に短波長の青紫色の光が吸収されて黄色を発現するのであるが, ベンゼン核の π 4₂ の位置にアミノ基が結合すると吸収帯が長波長側に移動して色が深くなることが知られている。

Table I anthocyanin の呈色反応

	原液	pH (磷酸緩衝液)			アルコール	アルコール + 酢酸ソーダ	アルコール + 炭酸ソーダ	塩化第二鉄	Fehling
		5.29 6.81	6.81 6.98	6.98 8.04					
Crude anthocyanin	暗赤色	赤褐	赤紫	青紫	暗赤紫	濃紫	濃紫	青紫	暗青紫
Fraction I	ボタン色	赤	赤紫	青紫	赤紫	紫	紫	青	青
Fraction II	赤色	赤	赤紫	青紫	橙赤	紫	紫	青	青
Fraction III	淡橙褐色	淡赤	赤紫	青紫	橙赤	淡紫	淡青	淡青	淡青

(註) 但し, これは溶媒添加直後の色調である。

Table. II The effect of pH on spectral maxima of anthocyanine in visibee resin

	水	B. A. W	pH (磷酸緩衝液)		
			3.7	6.4	7.8
Crude anthocyanin	535	547	535	550	580
Fraction I		550			
Fraction II		547			
Fraction III		545			

以前から砂糖の類の溶液が溶存すると anthocyanin の色が幾分濃くなる事が知られており、又、エニンの稀塩酸溶液にタンニン酸や没食子酸を加えると色が更に青色を加えることが見出されているが、これらは有機酸の COOH, 糖の OH 基が発色団に対して助色的に作用しているものと考えられる。この様に色素の色が溶媒によって変わるのであるが Spectrum の点では如何になっているのであろうか。

Crude anthocyanin 及び各 Fraction について可視部スペクトルを Table II にまとめた。

明らかに Fraction I, II, III の各スペクトル吸収の極大の位置に差が認められる。即ち Fraction I, II, III, ではそれぞれ 550, 547, 547m μ に最大の位置を持つ。Crude anthocyanin を水で溶かすと B. A. W のものより 12m μ 短波長の方にピークが移動する。又 pH を変化させることによって分る様に色素の吸収帯は可なり大きく変動する。250~650m μ の範囲でそれぞれについて Optical Density を測定したのが、Fig 3~10である。Fig 3, 4, 5. に示されている可視部でのすべての Fraction には 1 個の吸収帯が認められる。

Fig. 3 Fraction I

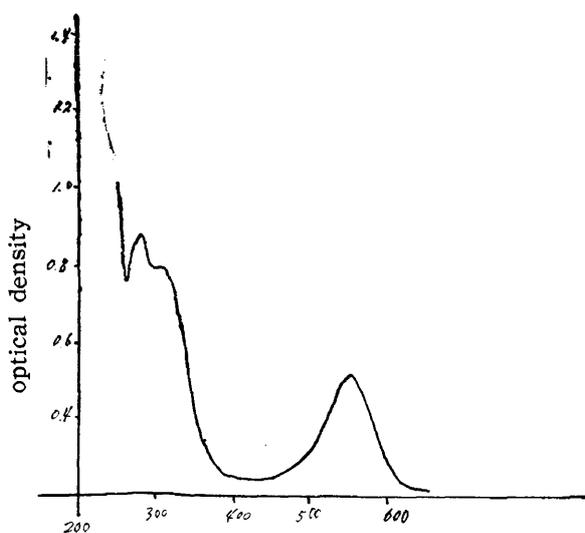


Fig. 4 Fraction

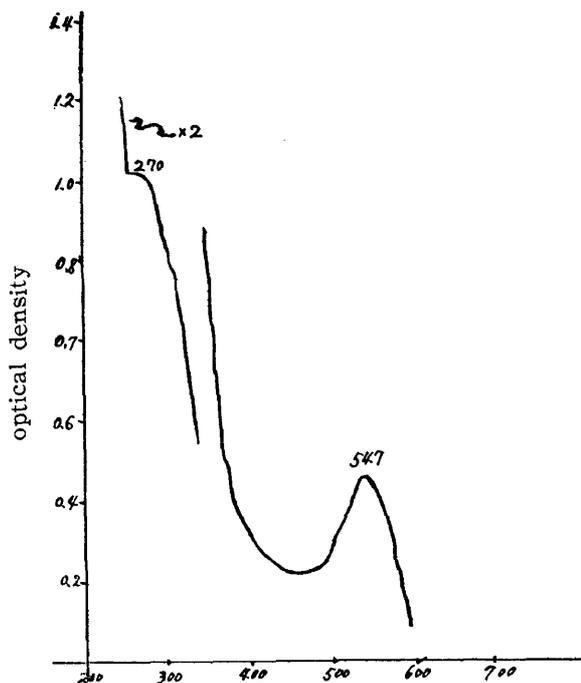


Fig. 5 Fraction

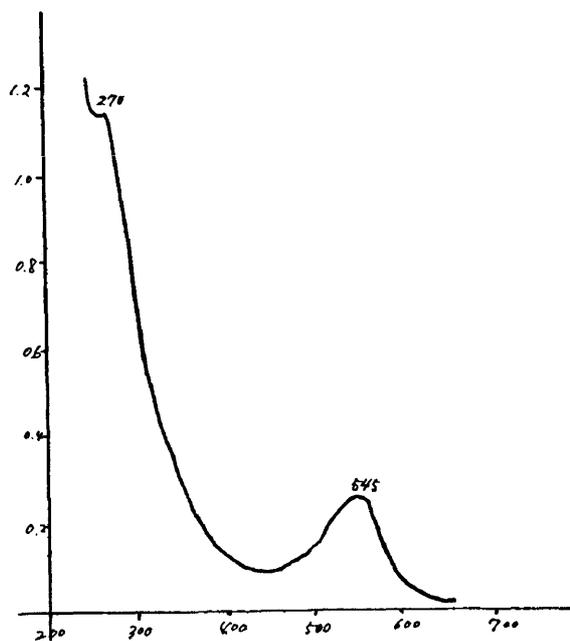


Fig. 6 Crude anthocyanin (水にてとがしたもの)

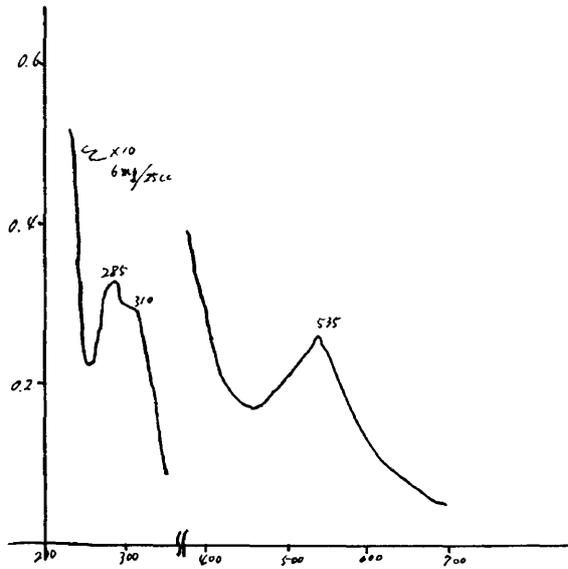


Fig. 7 Crude anthocyanin (B. A. Wにてとがしたもの)

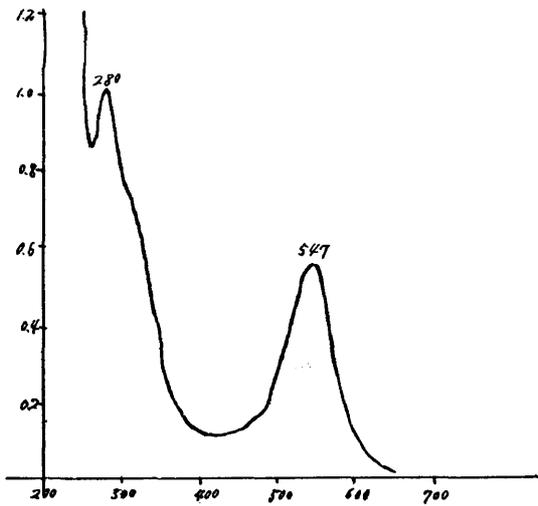


Fig. 8 Crude anthocyanin pH=3.7

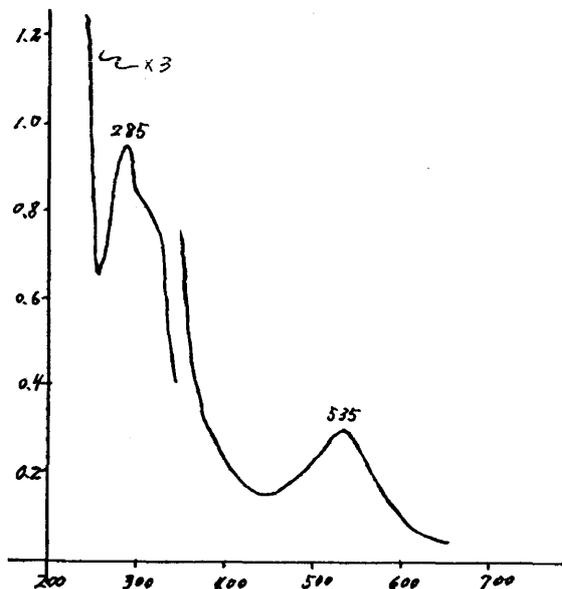


Fig. 9 Crude anthocyanin pH=6.4

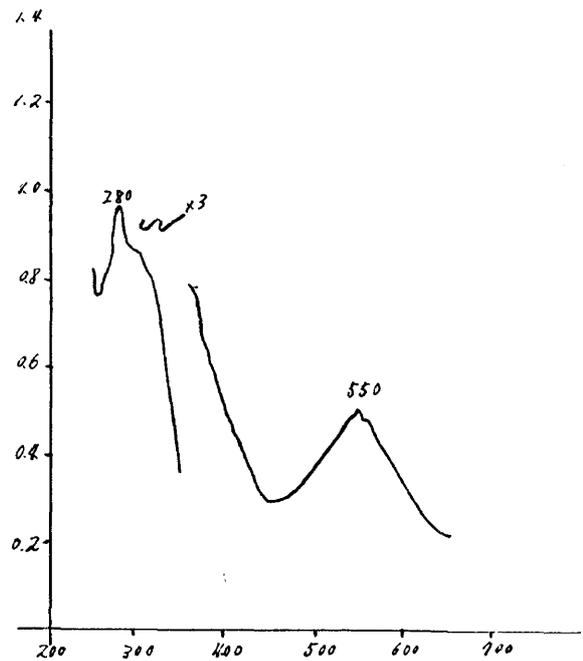
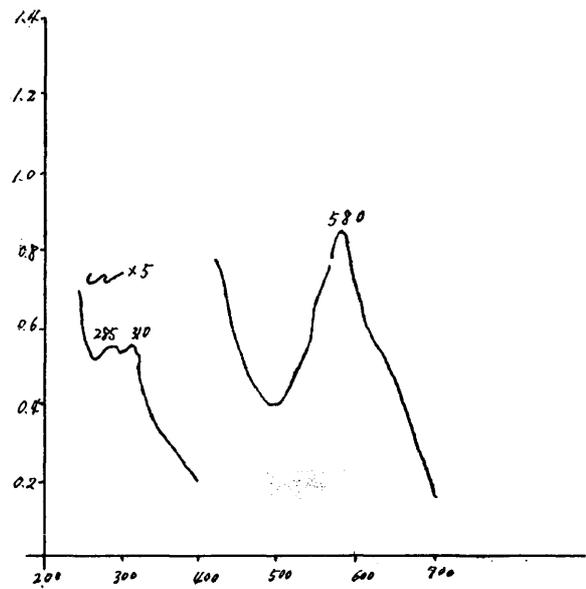


Fig. 10 Crude anthocyanin pH=7.8



色素の吸収極大の最小 450m μ に対する百分率を示したのが Table III である。

Table III. The optical Density at 450m μ was compared with that at the maximum wavelength

	$\frac{E_{450}}{E_{\max}} \times 100$
Fraction I	15.4
Fraction II	45.2
Fraction III	34.0

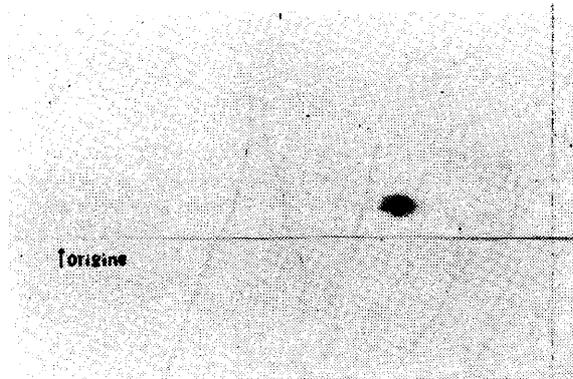
Fraction I の値は II・III に比らべて $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ である。この値は Horborne の値と良好な一致を示し、De

lphinidin 3.5 diglucoside であることが推測せられた。anthocyan系色素はそれぞれ特有のスペクトルの波長を有し、これによって色素を固定することが出来るという Horborne の報告があるが、色素がpH、金属塩及び溶媒の種類等によってもそのスペクトルの波長を変え、しかも同一系の anthocyanin にしても波長の差は2~3 m μ の極く少差(例えば cyanidin3-monoglucoside, 525m μ cyanidin 3-5-diglucoside 525m μ)であるので波長測定には余程の注意を必要とするものである。

Fig. 3 に示されている Fraction I の紫外部では、280m μ の他に310m μ にピークを示し、これは、Horborne の報告からも分る様に、Coumaric acid に基づくものである。Fraction II・III の310m μ の位置ではなだらかな shoulder をなしているがこれでは、Coumaric acid が結合しているかどうかは疑問である。

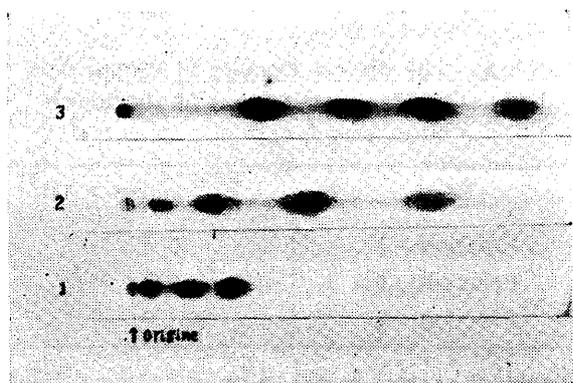
次に以上の実験結果と Paper chromatography の結果と比較検討するために、先ず第一に Crude anthocyanin を塩酸で加水分解し、B. A. W の溶媒で Paper chromatography を作製してみた (Fig. 11)。

Fig. 11



movement of Delphinidin on Toyo paper: when developed with B. A. w Rf value : 0.42

Fig. 12



paper chromatogram of crude anthocyanin

1. BuHCl 2. 1% HCl 3. B. A. W

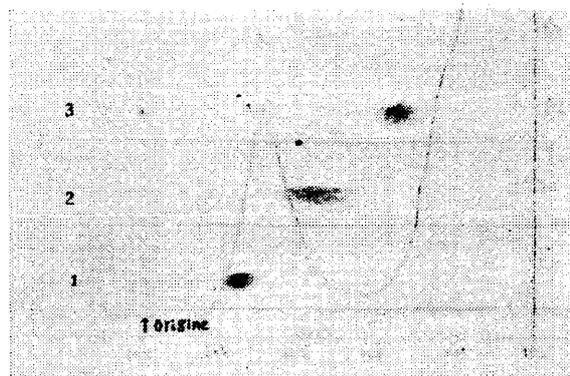
この Rf 値は0.42を示し先人の報告^{10) 11)}に一致をみ、色素の aglucone は Delphinidin であることが推定出来た。Crude anthocyanine の Paper chromatography の結果は Fig. 12に示すがごとく泳動を異にした4個の spot を認めることが出来た。唯、Rf 値の最大を示す spot については詳しい分析の必要がある。又種々の溶媒での各 spot のRf値は Table IVに示した。

Table IV Rf values of crude anthocyanin

溶 媒			Crude anthocyanin			
B	A	W	0.15	0.26	0.35	0.45
1	%	HCl	0.04	0.10	0.21	0.34
Bu	HCl		0.03	0.08	0.12	(-)

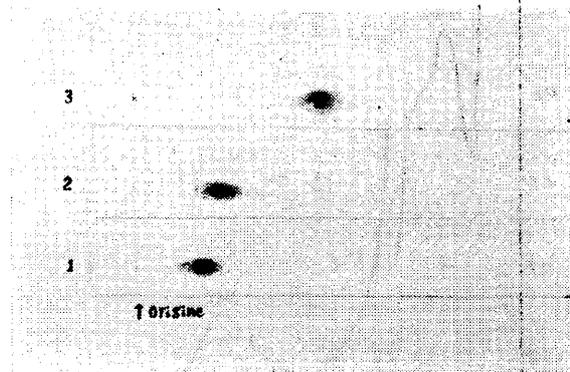
更に Column で分割した Fraction I・II・III の Paper chromatography はそれぞれ Fig 13. 14. 15 の如くで Rf 値は Table V にまとめた。

Fig. 13



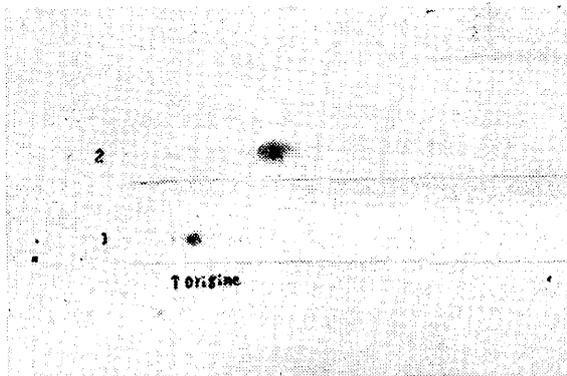
paper chromatogram of Fraction I When developed with BuHCl(1), 1% HCl(2) and B. A. w(3)

Fig. 14



Paper chromatogram of Fraction II when developed with BuHCl(1), 1% HCl(2) and B. A. w(3)

Fig. 15



position of Fraction III after paper chromatographic development with BuHCl(1) and B. A. W(2)

Table IV Rf values of Anthocyanins

	B. A. W	1%-HCl	Bu HCl
Fraction I	0.32	0.19	0.12
Fraction II	0.23	0.10	0.08
Fraction III	0.13	(—)	0.03

Table IV に示した Crude anthocyanin の内で原点に近い3つの Rf 値は Table V に示す Rf 値にはほぼ一致する。即ち Paper chromatography に於いては塩酸の濃度が少々変ったり、溶媒の放置時間によっても spot の位置にかなりの変動を来たすことを考えると Rf 値の少々誤差は免がれざるを得ない。そこでこれらの Rf 値をほぼ確実なるものと考えて、J. B. Horborne の anthocyanin の Rf 値表から Fraction I は Delphinidin-3-5- diglucoside-p-Coumaricacid, Fraction II は Delphinidin-3-monoglucoside, Fraction III は Delphinidin-3-5-diglucoside が推測し得る。しかし黒田, 和田氏等の研究によると、茄子の色素の分子式は、Delphinidin の 3-5- の位置には糖は存在しないと報告しており、前記の optical Density の測定による結果と考え合わせると、Fraction I は Delphinidin-3-diglucoside-p-coumaricacid 即ち Hyacin と推定した。

IV 総 括

- 1) Column chromatography によって Crude anthocyanin から3つの Single anthocyanin を分割することが出来た。
- 2) Anthocyanin は酸性では赤色、アルカリ性では青色を呈し、有機酸、金属イオンによってもその色調を変えた。
- 3) 各Fraction 及び Crude anthocyanin の可視部

スペクトルのピークは1個であり、pH や溶媒を変えることによってその波長は変わった。

- 4) 紫外部のスペクトルに於ける2つのピーク、280, 310m μ を示した Fraction I を nasunin と確認した。
- 5) Fraction II は Delphinidin-3-monoglucoside, Fraction III は Hyacin と推定した。
- 6) Crude anthocyanin を加水分解することによって aglucone を得た。
- 7) 茄子の外皮全体としては微量であるがフラボン色素のクウエルセチン、クロロフィル、カロチン等が Paper chromatography により認められた。

以上の様な結果を得たが、茄子の色素は非常にデリケートで変化しやすいものであった為に諸実験に於いて困難を極めた。

本研究に於いては Paper chromatography 及び Spectro photometry 等によって茄子の色素について追求したが、後者に於ける設備の都合により、データに不十分なところがあったのが残念に思う。色素研究には Spectrum は今後ますます利用され発展して行くものと思われる。

参 考 文 献

- 服部静夫 植物色素
 刈米達夫 植物成分の化学
 柴田桂太 資源植物事典
 平尾子之吉 日本植物成分総覧
 日本女子大学食物学教室編 調理科学総典
 生物化学ハンドブック
 Agricultural and Biological, vol 25, No10 1961
- 1) Kuroda & Wada : proc Imp acad 9. 51, 1933
 - 2) Robinson G, M & Robinson. R : Biochem J 26, 1647. 1932
 - 3) Bate Smith E. C : nature. 61, 735, 1948
 - 4) Hayashi & Abe Y : Bat Mag Tokyo 69, 577. 1956
 - 5) Harborne J. B : Biochem. J. 70, 22. 1958
 - 6) 佐竹一夫 : クロマトグラフィー
 - 7) 山口一孝 : 植物成分分析法 上巻 p220
 - 8) K, Shibata, Y. Shibata. & I., Kashiwagi. : J Amen chem Soc 41, 208. 1919
 - 9) G. M. Robinson & R. Robinson : Biochem J 25, 1689. 1931
 - 10) E, C Bate Smith : Biochem, soc Symposia 62 No. 3, 1949
 - 11) J, B. Horborne : Journal of chromatography vol. 1, 477. 1958