

水中におけるアントシアニン系色素の発色について

～水溶液中の水素イオンと水酸化物イオンの挙動～

千葉立薬園台高等学校化学部

吉村春菜

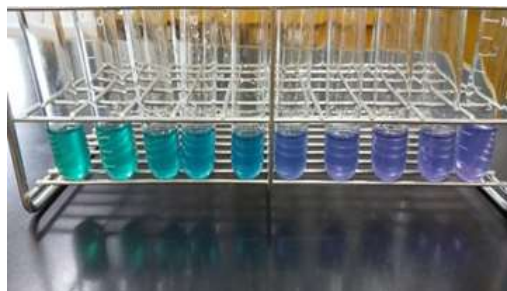
指導教員：古賀直子

研究概要

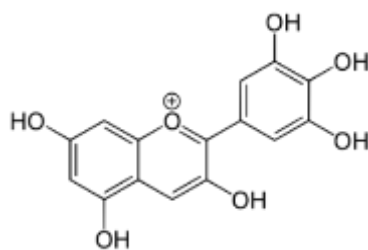
リンドウの色素であるゲンチオデルフィン¹は、デルフィニジン母核にグルコース3分子とコーヒー酸2分子をもつ多アシル化アントシアニンである。デルフィニジンに糖や有機酸が修飾した構造で発色するため、ゲンチオデルフィンもデルフィニジンと同様に不安定で中性下では無色となる。本研究では、酵素を失活させるためにマイクロウェーブを用いた後、水と反応させると中性付近でも青色を呈することがわかった。また、極性の高い（アルコール系）試薬を加えると、配糖体を取り除くことができ、さらに花びらを脱色し過後、水を加えると青色の水溶液を得ることができた。この色素は、ゲンチオデルフィンに結合している糖や有機酸がアルコールによって修飾が取り外され、アントシアニンの骨格であるデルフィニジンに変化したと推察される。



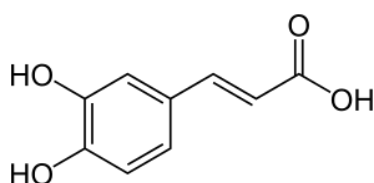
リンドウの色素



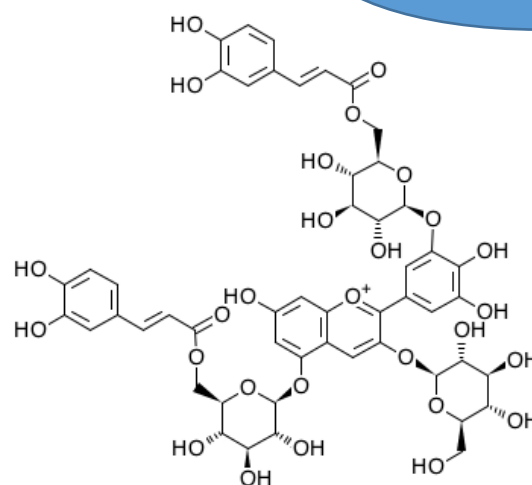
青色染料としての
提案



デルフィニジン



コーヒー酸



ゲンチオデルフィン Gentiodelphin

デルフィニジンを母核とした多アシル化アントシアニン

1. 研究の目的と背景

薬用植物の一種であるリンドウ (*Gentiana scabra var. buergeri*) は、本校の校章になっている。本校周辺は、江戸時代に薬園が開かれていたことから地名が薬園台とつけられ、そこでリンドウが栽培されていたというのが校章の由来である。リンドウはゲンチオデルフィンという青色系アントシアニンを含んでいる。このゲンチオデルフィンを染料にできないかと考え、研究をはじめた。実験の結果、ゲンチオデルフィンの抽出は、すぐに退色したり、抽出液が薄かったりと考えていたよりも染料とすることが難しかった。そこで、アントシアニンに関して記述された多くの文献の中から、構造と液性に着目して色素抽出の研究を行った。文献によると、アントシアニンの発色は大きく3つの構造があるとされ、それぞれ、 $\text{pH}4\sim6$ つまり弱酸性～中性付近で生じる紫色のシアニジン、非常に不安定な（簡単に水合して無色になる）青色のデルフィニジン、強酸性溶液中で安定な赤色を呈するペラルゴニジンである。強酸性下であればアントシアニンは安定する。そのため、メタノールを塩酸酸性にして抽出をするのが常法とされる。しかし、この方法では抽出液は青色ではなく赤色になる。リンドウの花で染色する際も、酸性下にして着色することが一般的である。(図1)

ゲンチオデルフィン、デルフィニジンに糖や有機酸が修飾した構造で発色するため、ゲンチオデルフィンもデルフィニジンと同様に不安定である。前述の通り、強酸性下では赤色を呈する。そこで、リンドウの花本来の色である青色を抽出する方法を見つけることを目的とし、実験を行った。



図1 デルフィニジンを塩酸酸性にして抽出

2. アントシアニン

アントシアニンの構造は、花や果実の色をつくり出す発色団であるアントシアニジンに、糖が結合した配糖体の形をつくる。植物によって糖の種類が異なり、多種の発色が見られる。アントシアニンを構成している色は大きく3つあり、シアニジン（紫色）、ペラルゴニジン（赤色）、デルフィニジン（青色）がある。この色素系の中心はシアニジンで水酸基が結合するとデルフィニジンに、水酸基が外れるとペラルゴニジンに変化する。

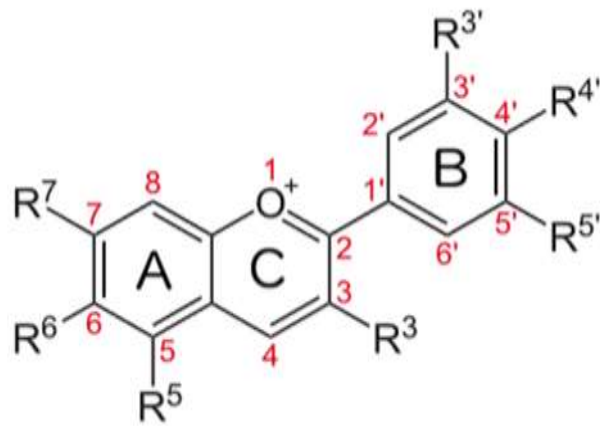


図2 アントシアニジンの基本構造

アントシアニン系の色素が酸性や塩基性で赤、紫、青と変化するのはアントシアニジンの構造が pH により変化するためである。アントシアニジンの基本構造はフラバンの形をとる。フラバンとは、ベンゼン環 (A と B) が 3 つの炭素で結合した有機化合物の総称である。R3'、R4'、R5'、R3'、R5'、R6'、R7'部分に水酸基-OH または、プロトン H⁺ が結合し、色が変わる。

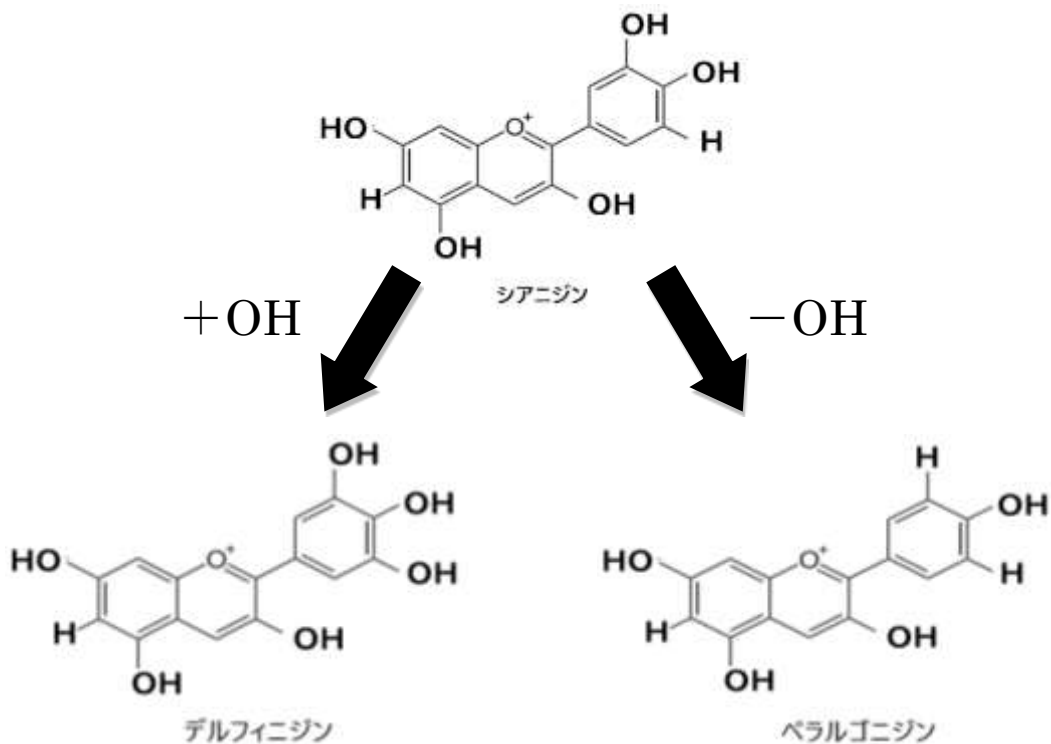


図3 シアニジンからの変化

シアニジン、デルフィニジン、ペラルゴニジンの 3 つのアントシアニジンは、B 環の R3'、R4'、R5' の部分に結合する水酸基によって決まる。R3'の部分にある水酸基が外れると酸性になり赤色のペラルゴニジンに、B 環の R5'の部分に水酸基が結合すると塩基性になり青色のデルフィニジンになることが知られている。(図3)

この3種類はアントシアニンの基本骨格であり、この基本骨格にメチル基や糖、有機酸が修飾されることで、多様な色を呈している。花が青色になる過程は、これまでに次の3種類があげられている。(吉田ら,1995) 一つめは金属錯体型アントシアニン、二つめは多アシル化アントシアニン、三つめに非化学量論的金属錯体である。リンドウの青色花弁色素であるゲンチオデルフィン^①は、デルフィニジン母核にグルコース3分子とコーヒー酸2分子をもつ多アシル化アントシアニンである。(後藤ら,1962) アシル化は有機化合物中の水素原子をアシル基 RCO-で置換する反応である。リンドウの場合は、デルフィニジン骨格に高度に修飾された、ゲンチオデルフィンが花弁に蓄積することで青い花になる。

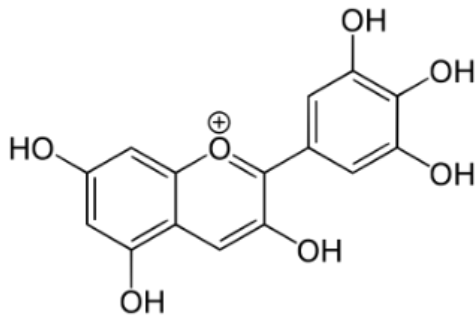


図4 デルフィニジン (母核)

Delphinidin

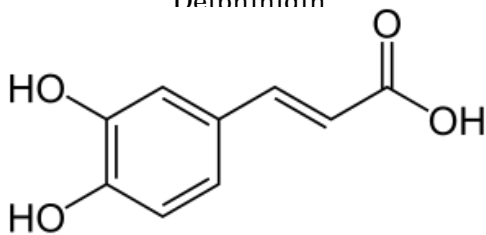


図5 コーヒー酸 Café acid

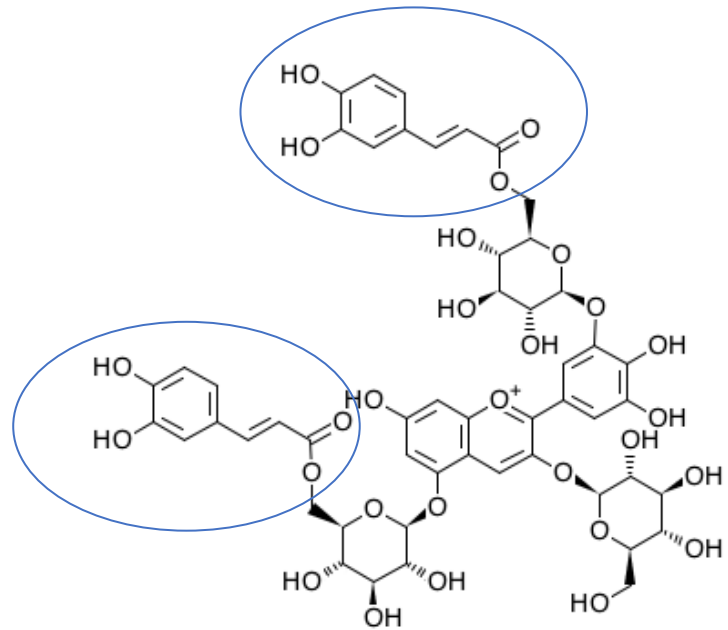


図6 ゲンチオデルフィン Gentiodelphin

青円内はコーヒー酸

3. 実験と結果

実験 1

文献により、アルコール系試薬が適しているのではないかと仮定し、デルフィニジン^②を抽出するのに適した溶媒を検討した。実験方法は、リンドウを色の濃い部分をハサミで切り取り (写真1 : ①)、花を開いて、花びら以外を取り除いた。(写真1 : ②) その後、リンドウ 5g に対して 10ml の溶媒を入れて、すり潰した。(写真1 : ③) 溶媒には、お湯、水、エタノール 50%、70%、99%、酢酸 (CH₃COOH)、アンモニア (NH₃) を使用した。



写真1 実験1の実験方法

その結果、お湯、エタノール 70%、酢酸、アンモニアを溶媒とした時濃く色が出た。(写真 2 : 左)しかし、24 時間後見ると全ての抽出液が退色していた。また、ゼリーのような沈殿ができていた。(写真 3) さらに、結果が良かったお湯、エタノール 70%、酢酸、アンモニアをリンドウ 10g に対し 30ml で再現してみると、色はまったく違ったものになり、同じ結果を得ることができなかった。(写真 2 : 右)



写真 2 左 : 抽出液の発色、右 : 再現した際の抽出液の発色
ラベル紫 : お湯、緑 : 水、赤 : エタノール 50%、黄 : エタノール 70%、
橙 : エタノール 99%、青 : 酢酸、白 : アンモニア

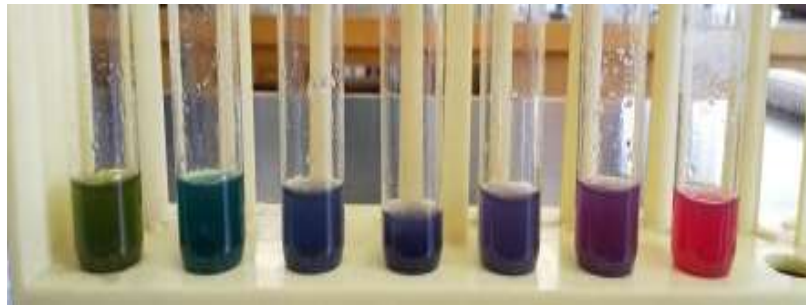


写真 3 ゼリー状の沈殿 (30g の花卉を使用した結果)

実験 2

実験 1 より抽出液が退色したため、この退色を花卉内の酵素の反応によるものとして推察し、加熱をして酵素を失活させた。実験は、リンドウの青い部分を細かく切り、5g をマイクロウェーブで 700W、30 秒で処理した。その後、メタノール 80%、エタノール 20%に入れ、できた抽出液が退色しないか観察した。メタノール 80%、エタノール 20%を溶媒としたのは、予備実験でメタノール 80%、エタノール 20%が花の色を脱色させるのに適していることが確認されたためである。

実験の結果、12 時間たっても青色のまま変化しなかった。マイクロウェーブを利用したことで、アントシアニンが他の物質に変化した可能性があるため、身近な指示薬として知られている紫キャベツと比較して pH による発色の変化を見た。(写真 4) 色の変化が紫キャベツとリンドウで同じだったため、加熱によりアントシアニンが変化しないことが確認できた。実験結果から、リンドウをマイクロウェーブで処理することは適していることがわかった。



塩基性 ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ 酸性



写真4 上段リンドウ、下段紫キャベツの抽出液と pH の関係及び色素の比較
 ①pH12.5 付近、②pH11.5 付近、③pH8.5 付近、④pH7.0 付近、⑤pH3.5 付近、
 ⑥pH2.5 付近、⑦pH1.5 付近

実験 3

実験 1 の結果より、抽出液に沈殿物がみられたため、その沈殿をアントシアニンに結合している糖だと仮定し、沈殿の正体と取り除く方法を検討した。リンドウの青い部分を 5g 切り取り、細かく刻んでマイクロウェーブで 700W、30 秒の処理をした。エタノールとメタノールの混合液を抽出液として 45 分間静置した。その後ろ過し、沈殿物のフェーリング反応をみた。

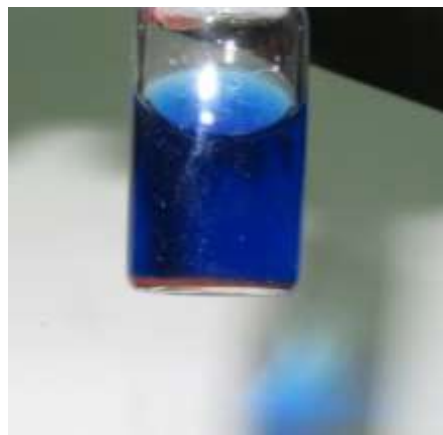


写真 5 フェーリング反応

結果は、フェーリング液には少量ではあるが赤色沈殿がみられた。(写真 5) したがって、実験 1 でみられた沈殿物は糖であり、アルコール系試薬で抽出したる液には糖が含まれていることがわかった。この実験により、糖を取り除くにはアルコール系の試薬を使用するのが良いことがわかった。しかし、

アントシアニジンは配糖体の形で存在しているため、青色素もみられなくなった。このとき、ろ過した際の色落ちした花びらが青色になっていた。

実験 4

実験 3 の結果より、ろ過後の脱色していたはずの花びらの色が青くなったので、花びらが空気中の物質と反応したと仮定し、反応した物質を検討した。リンドウの花びら 5g を細かく切り、マイクロウェーブで 700W、30 秒で処理した。エタノールとメタノールの混合液を抽出液として、45 分間静置し、ろ過した。窒素、酸素、二酸化炭素を入れた袋にそれぞれ花びらを入れ、24 時間静置し、花びらを観察した。その結果は、花びらの色に変化はなく、脱色したリンドウは窒素、酸素、二酸化炭素とは反応しないことがわかった。

実験 5

実験 4 の結果より、脱色したリンドウは空気中の窒素、酸素、二酸化炭素とは青色に反応しないことから、空気中の水と反応したと仮定し、反応した物質が水であるか検討した。リンドウの花びら 10g を細かく切り、マイクロウェーブで 700W、60 秒で処理した。エタノールを抽出液とした。45 分間静置。ろ過し、脱色した花びらに水を入れ観察した。(写真 6) 24 時間放置し、抽出液の吸光度を分光光度計(ERMA INC, AE-450N)で測定した。



写真 6 脱色した花びら（左）に水を入れ、24 時間静置すると青色に変化した（右）

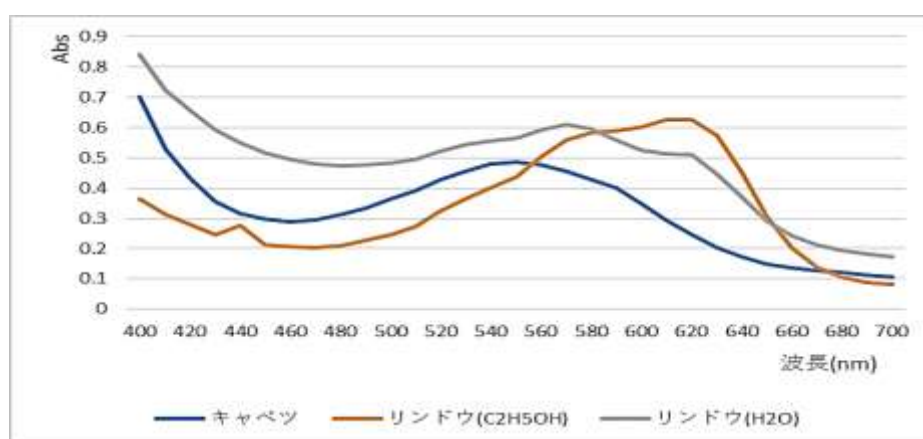


図 7 リンドウをエタノールと水で抽出した場合の吸光度のグラフ

その結果、脱色したリンドウと反応した物質は水であることがわかった。さらに、リンドウの花びらをアルコールで脱色した後、水で抽出すると青色を呈することがわかった。(写真 7) また、実験は

3 回以上行ったが同様の結果を得ることができた。吸光度を測定した結果、アントシアニンの波長である 520~540nm とは少しずれていた。(図 7)

実験 6

実験 5 から、リンドウの花びらをアルコールで脱色した後、水で抽出すると青色を呈することがわかった。水は溶液中でごくわずかではあるが、電離 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$ をしている。このときの溶液の pH は塩基性を示したことから、 OH^- は液中に残り、 H^+ は構造に使われた。(図 5) H^+ は電子を得るために還元をし、 O と結合したことで構造は安定したため青色を呈したのではないかと仮定し、水で抽出すると青色を呈する理由を解明した。実験 3 の色素抽出方法でリンドウの花びらの量を変えて抽出液をつくった。その後、抽出液に 0.01mol/L 塩酸 HCl 水溶液と 0.01mol/L 水酸化ナトリウム NaOH 水溶液をそれぞれ 1ml から 5ml まで加えた。 H^+ 、 OH^- の量的な関係と pH の変化による吸光度を測定した。

□吸光度

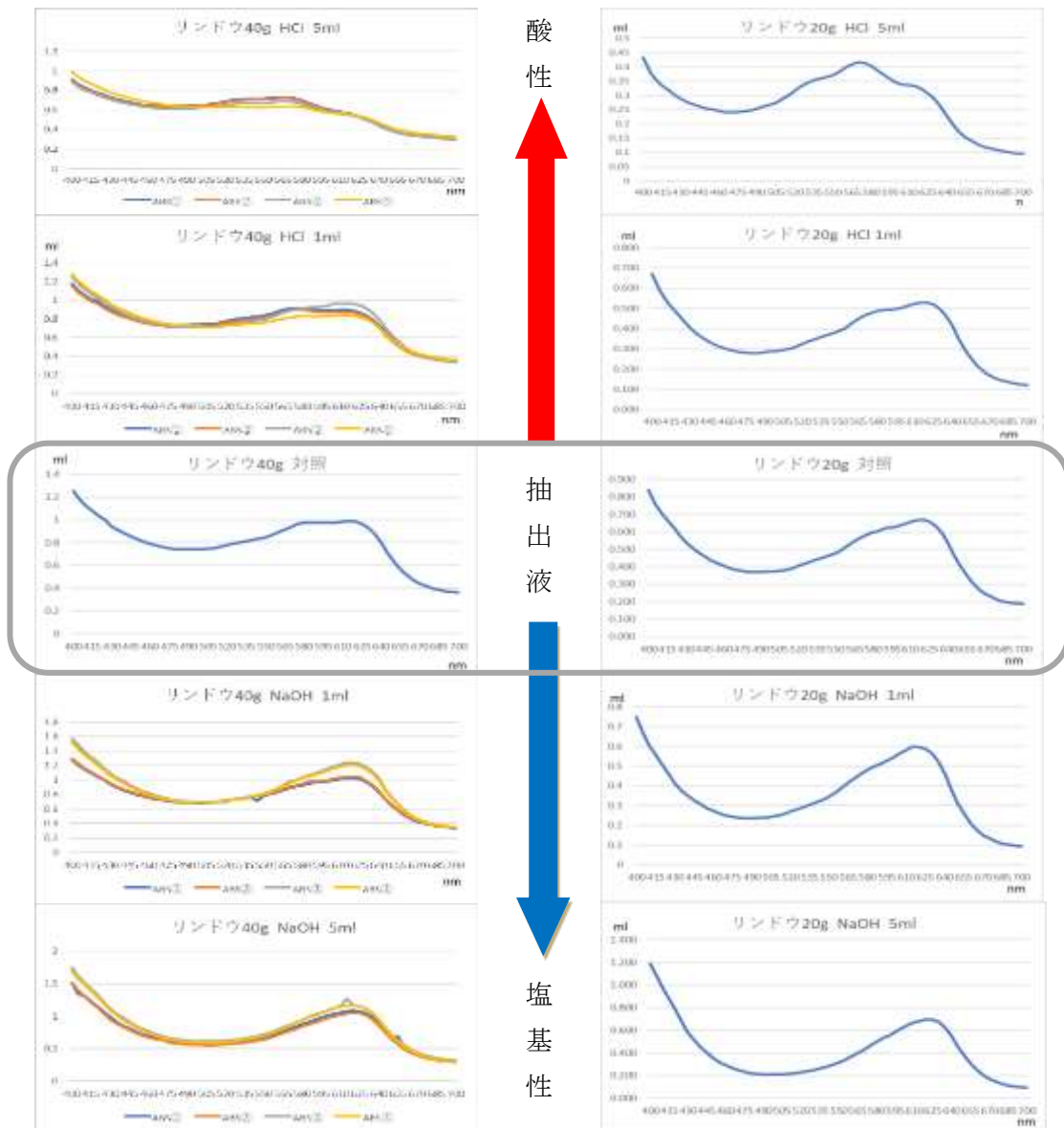


図 8 H^+ 、 OH^- の量的な関係と pH の変化による吸光度のグラフ

□比色

塩基性



酸性

塩基性



酸性



4日後



写真6 pHの変化による色の变化

その結果、塩酸を加える量を増加させると、波長が波長域の低い方へとピークが変化した。また水酸化ナトリウムは加える量を変えても全て 615~620nm の波長域でピークが見られた。抽出液は塩基性を示した。4日後、色が退色した。

実験2により、マイクロウェーブによる熱処理によりデルフィニジン骨格は変化しないと結論づけたが、その骨格に修飾された糖や有機酸は構造変化している可能性が判明した。マイクロウェーブでの熱処理がデルフィニジン骨格から糖や有機酸を外し、マイクロウェーブはアルコールと同じ働きをすると仮定し、実験4の抽出方法がアルコールでの処理をせずとも成立するのかを検討した。リンドウの花びら5gを細かく切り、マイクロウェーブで700w、30秒処理した。その後、水を入れ観察した。48時間放置し、抽出液の吸光度を分光光度計で測定した。比較として、実験5の抽出方法も用意した。ただし、2つは水を入れる時間を一致させた。その結果、アルコールで糖や有機酸を外さずに、マイクロウェーブの働きだけでも青色を呈することができた。



写真10 右：アルコール処理あり 左：水のみ

分光光度計で測定した結果、波長のピークはメタノール抽出液と水の抽出液で異なっている。

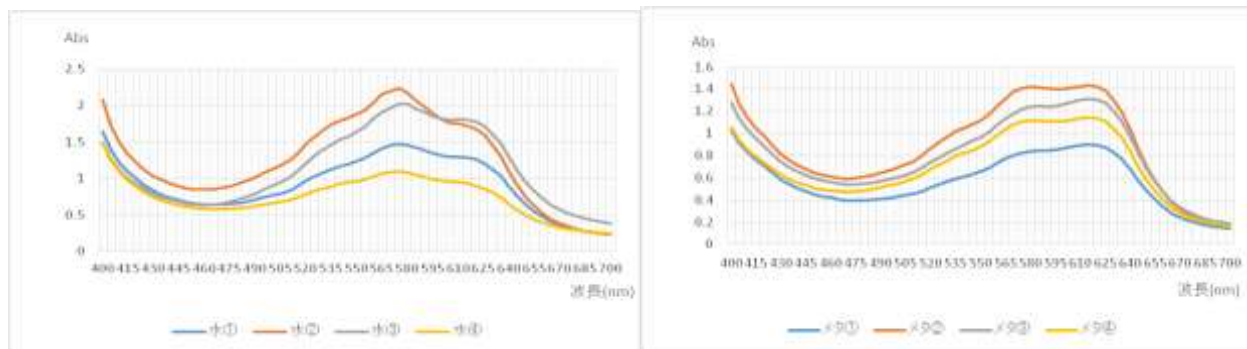


図9 アルコール処理あり(右)、水のみ(左)の抽出液の吸光度

抽出液は青色を呈したことから、少なくともマイクロウェーブはアルコールと同じようにゲンチオデルフィンに修飾されている糖や有機酸の結合を外すことがわかった。

4. 考察

結果から、抽出液は H^+ や OH^- によって平衡状態をつくっていることがわかった。アントシアニン系の色素は pH が変化することでその構造が変わり、色が発色することが知られているが、本実験の抽出液も塩酸や水酸化ナトリウムを加えることで同様の現象が起こった。アントシアニン系の色素は塩基性で青色に呈色する。本実験の抽出液も青色を呈し、pH を測ってみると、9.00 付近であった。このことから、抽出液はリンドウの花由来のアントシアニン系の色と判断できる。またヒトの眼での色の判断と pH との関係を見ると、色の変化は pH 試験紙では測れない、水素イオン H^+ の濃度で起こっていることがわかった。

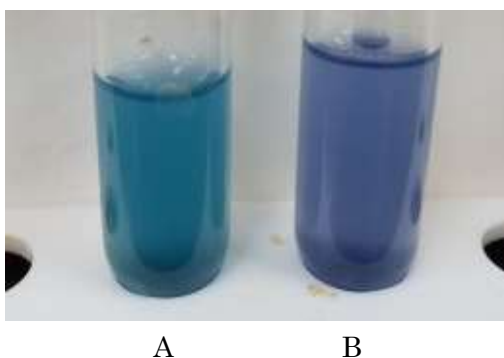


写真 13 比色 A 抽出液、B 抽出液+二酸化炭素

溶液中で不安定なデルフィニジンはアルコールで一度色を落とし、ろ過をして水を入れることで青色の抽出液が得られることがわかった。アルコールを入れると、デルフィニジン骨格に修飾された糖や有機酸が外れ構造上色として成り立たなくなるため、無色になる。また、ろ過した液体は pH による色の変化が確認できたので、糖だけでなくアントシアニンも溶けだしていることがわかった。ろ過後の脱色した花びらに水を入れると、追加実験 1 での仮説では、デルフィニジンの構造の一部が酸素 O と結合して青色を呈したのではないかとしたが、結果から発色しているのがデルフィニジンだとすると発色するためには糖と結合して配糖体の形でないと色の発現はみられないため、仮説は成り立たないと結論した。

さらに、追加実験 2 よりアルコールでの処理を施さなくても抽出液は青色を呈したことから、マイクロウェーブでの熱処理はデルフィニジン骨格から糖や有機酸を外し、マイクロウェーブはアルコールと同じ働きをされると考えられる。そして、水を入れることで糖や有機酸が外れた部分に水酸基が置換し、デルフィニジン骨格となったため青色を発色したと思われる。この抽出方法は実験 5 の抽出方法よりも安全かつ環境にやさしいので、実用化が期待できる。

5. まとめと今後の展望

リンドウの花びらから青色の抽出液を得る方法を発見した。今後は、リンドウの花びらをアルコールで脱色した後、水で抽出すると青色を呈する理由や水だけで抽出する際との構造変化の違いをより詳しく解明するべく研究を続けていきたい。今回発見した抽出方法また、本来の目的である、リンドウの花の色で染色する実験も進めていきたい。

6. 参考文献

- ・キリヤ化学ホームページ
- ・名古屋大学大学院吉田研究室ホームページ
- ・箕輪直子「草木染め大全」
- ・齊藤規夫「花の色とアントシアニンの化学」蛋白質核酸酵素 Vol.47No.3、2002
- ・津田孝範「植物色素アントシアニンのサイエンス」一般財団法人食品分析開発センター
- ・中嶋一郎・山崎真巳・齊藤和希「アントシアニン生合成の生化学」蛋白質核酸酵素 Vol.47No.3、2002
- ・後藤俊夫、近藤忠雄「花の色—アントシアニンの色と安定性」化学と生物 Vol22,№12
- ・農研機構ホームページ 花き研究所「青色」 <http://www.naro.affrc.go.jp/>
- ・齊藤規夫「花をつけないシダ植物で花の起源を探る」季刊誌「生命誌」通巻 14 号
- ・吉田久美「アサガオの花はなぜ青くなるのか？」季刊誌「生命誌」通巻 14 号