

# サルビア・ウリギノーサ (*Salvia uliginosa*) の 青色花卉由来の新しいメタロアントシアニン

水永武光, 沢村めぐみ, 吉岡里見, 村上睦朗

## A New Metallo-Anthocyanin from the Blue Petals of *Salvia Uliginosa*

Takemitsu MIZUNAGA, Megumi SAWAMURA,  
Satomi YOSHIOKA and Mutsuo MURAKAMI

### Summary

A blue pigment complex was isolated from the blue flowers of *Salvia uliginosa*. The absorption spectrum of its aqueous solution has three maxima 644.8, 586.8, and 314.4nm. On dialysis, the blue pigment was impermeable through a cellulose membrane, as in the case of proteodelphin and commelinin. The blue pigment contains magnesium as a metal component, but not manganese, aluminium, zinc, calcium or iron. The blue pigment was suggested to be composed of delphinidin 3-O-[6-O-(p-coumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside]-5-O-[4-O-acetyl-6-O-malonyl- $\beta$ -D-glucopyranoside], apigenin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 4")- $\beta$ -D-glucopyranoside-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and magnesium. The results show that the blue pigment from *Salvia uliginosa* is the fourth metallo-anthocyanin following commelinin from blue flowers of *Commelina communis*, protocyanin from blue corn flower, *Centaurea cyanus*, and protodelphin from blue flower, *Salvia patens*.

### 緒言

花の色ほど人間の生活を豊かにしてくれるものはない。色とりどりに咲き乱れる花壇や豪華な花束でなくても、部屋の中にたった一輪の花があるだけでうらおいを与えてくれる。花の多彩な色調、特に紫から青色はほとんどアントシアニンによる。アントシアニン色素は、リトマスと同じようにpHによって色調が変化し、酸性領域で赤色、アルカリ性領域では青色となる。しかし、中性からアルカリ性領域では、発色団のアントシアニン母核が容易に水和され速やかに退色するため、試験管内で青色を安定に再現することは非常に難しい。にもかかわらず、自然界には多くの青色の花が存在し、その色は長期間にわたって安定に保たれる。この花色の発現と安定化は大きな謎として、古くから化学者・生理学者を魅了し、多数の説が提出されてきた。

pH説、金属錯体モデル(メタロアントシアニン)、分子間コピグメンテーションモデル、分子内コピグメンテーション(アシル化アントシアニン)モデル、などの説やモデルが提出されている(本多・齋藤, 1998.)。しかし、私達の身近にある多くの青い花が、以上のモデルのどれに相当するのかとなると、必ずしも明らかではない。

恵泉女学園園芸短期大学園芸生活学科のキャンパスには数百種類の草花が植えられており、その中で特に興味を引く青色花である、サルビア・ウリギノーサに私達は興味をひかれた。文献を調べても、特にその花色構造についての報告もなかったため、当研究者等はこの花の色素構造について研究することとした。研究の結果、このサルビア・ウリギノーサの色素が新しいメタロアントシアニンであることが、明らかになったので、以下に報告する。

## 材料と方法

### 1. サルビア・ウリギノーサの栽培と花卉の採取

サルビアの苗(丈10cm, 葉が4枚程度ついたもの, サルビアの場合には茎の途中から根が発根するのでどこで切っても良い)をパーミキュライトとパーライト(1:1)の混合土に植え, 日の良くあたる場所に置く. 植え方の間隔は2cm×2cmくらい. 土の蒸散を防ぐ為に濡らした新聞紙をかぶせた. 草丈が15cmくらいになったとき, 肥料(腐葉土, 石灰, 化成肥料)を適量与えた畑に20cm間隔に植えた. 8月中旬以後空色に咲いた花を採取し, 凍結乾燥したものをデシケーターに保存した.

### 2. 花卉からの色素抽出と精製法

#### (1) 花卉からの色素抽出とエタノールによる分画

乾燥花卉20gを500mlのビーカーに入れ, 240mlの純水を入れ, ゆるく攪拌し, 4℃の冷蔵庫に3時間放置する. ガーゼで絞った抽出液を冷却遠心機で13000rpm×20min行った上澄み, 125mlに対して, 林と武田の方法をもとにエタノール沈澱(Hayashi and Takeda, 1970)を行った. 図-1にその方法を記す. 得られた青い色素の沈澱物を少量の水に溶かし次ぎのクロマトグラフィーを行った.

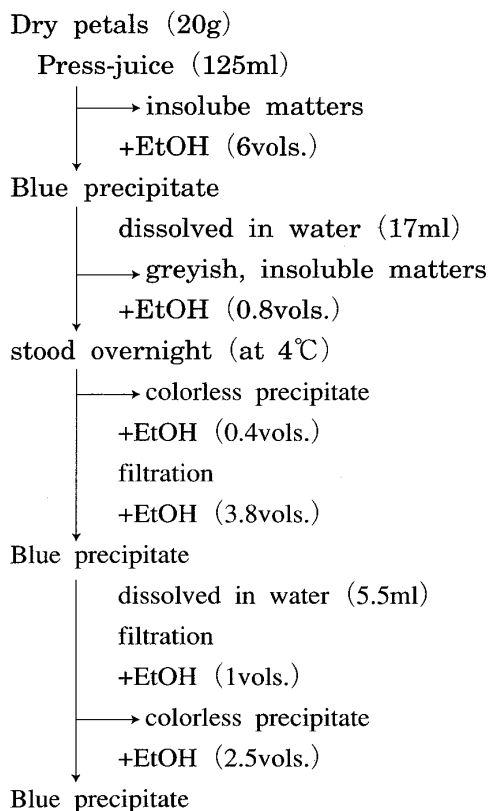


図-1 サルビア・ウリギノーサ青色色素のエタノール沈澱による分画.

#### (2) Sephadex LH20カラムクロマトグラフィー

0.8x25cmのガラスカラムに純水で膨潤させたSephadex LH20のゲルをつめカラムを安定化させた後, 上記青色沈澱物を少量の純水(4ml)に溶かし, カラムにアプライシクロマトグラフィーを行った. 溶出液を各2mlづつ集め, それぞれについて吸収スペクトルをとり, 青色色素として, 純粋と考えられる部分をまとめた.

### 3. サルビア・ウリギノーサ青色花卉からのアントシアニンの精製

精製青色色素からアントシアニンを分離し, その構造解析をするのも一つの方法であるが, 分析する場合, かなり多くのアントシアニンが必要であるので, ウリギノーサの青色花卉より直接, アントシアニンのみを抽出, 精製した. 抽出はギ酸:メタノール:水(5:50:45, FMW)で行い, ダイアイオンHP-20クロマトグラフィー, SephadexLH20クロマトグラフィー, ペーパークロマトグラフィー(東洋濾紙, No.50)により精製した.

#### 4. 吸収スペクトル; 日立分光光度計U-3200を用いた.

## 結果

### 1 精製青色色素の吸収スペクトル

サルビア・ウリギノーサとよく似たサルビア・パテンスの青色色素がMgを含むメタロアントシアニンであることが報告されている(Takeda et al., 1994). この青色色素はアントシアニンとしてデルフィニジン-3-(6"-パラクマロイルグルコシド)-5-(6"-マロニルグルコシド)を含み, フラボンとしてアピゲニン7, 4'-O, O-ジグルコシド(II)を含むことが再構成実験によって明らかにされている. サルビア・パテンスの青色色素に含まれているアントシアニンとサルビア・ウリギノーサに含まれているアントシアニンも酷似しており, サルビア・ウリギノーサのアントシアニンはサルビア・パテンスのアントシアニンがアセチル化されているだけである(下記). また, サルビア・ウリギノーサ花卉にはアピゲニン7, 4'-O, O-ジグルコシド(II)の他にアピゲニン7-O-β-D-グルコピラノシル(1"→4")-β-D-グルコシピラノシド(I), アピゲニン7-O-β-D-グルコピラノシル(1"→4")-β-D-グルコピラノシド-4'-O-β-D-グルコピラノシド(III)が含まれており(Veitch et al., 1998), 上記アピゲニンのどれかが含まれている可能性も充分に考えられる.

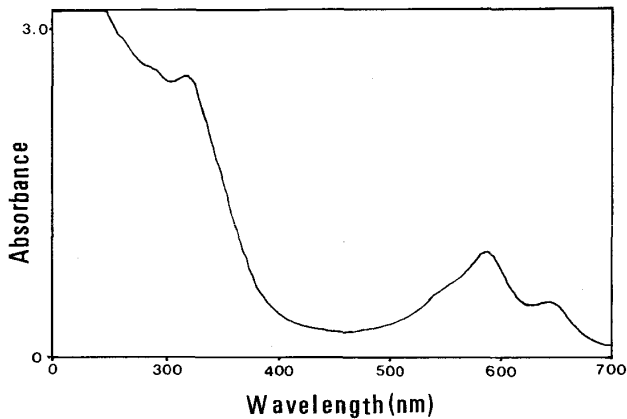


図-2 サルビア・ウリギノーサの青色花卉水抽出液の吸収スペクトル。  
644, 593, 316nm に吸収極大値が観察される。

一般に青色花卉抽出液の吸収スペクトルをとると、図-2に示すように、315nmあたりと590nmあたりに吸収ピークが現れる。

サルビア・パテンスの精製青色色素の吸収スペクトルと再構成により青色発現した色素の吸収スペクトルを比較すると、吸収ピークであるOD317とOD590の比では、精製色素では1以上であるが、再構成したもののそれは1以下となっている (Takeda et al., 1994)。我々のサルビア・ウリギノーサの色素抽出液の吸収スペクトルでは吸収ピークであるOD316とOD588の比では確かにはるかに1をこえているが、エタノールによる分画のあと、Sephadex LH20クロマトグラフィーを行ったものでは、吸収ピークであるOD314.4とOD586.8は1以下となっているのである (図-3)。このことをもとに、当研究者等はサルビア・ウリギノーサは上記の精製操作で精製されたものと考えた。

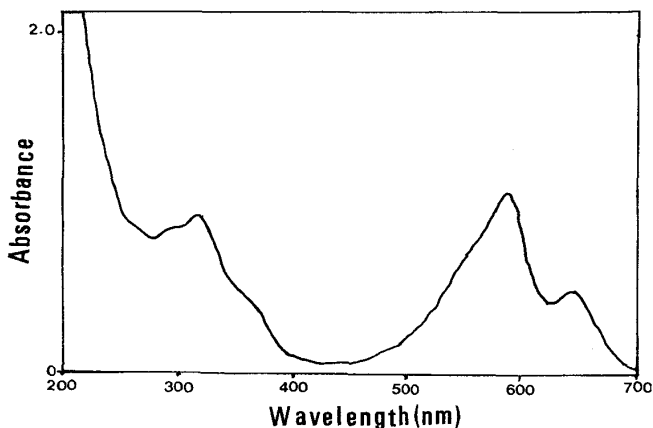


図-3 サルビア・ウリギノーサの精製青色色素の吸収スペクトル。  
644.8, 586.8, 314nm に吸収極大値が観察される。

## 2 精製サルビア・ウリギノーサ青色色素の構造と分子的性質

### 1) 物理構造

アントシアニンは単独ではせいぜい分子量900程度の大きさであり、透析性である。サルビアウリギノーサからギ酸：メタノール：水 (5：50：45, FMW) 抽出したアントシアニンと精製青色色素を透析した結果、精製青色色素は非透析性であることが分かった (図-4)。このことから、青色色素はかなり大きな分子複合体を形成していることが明らかとなった。

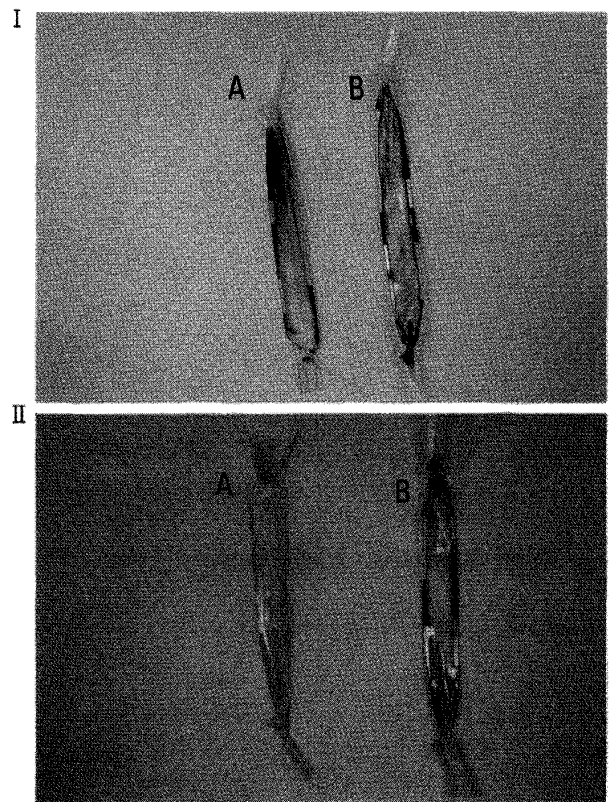


図-4 サルビア・ウリギノーサの青色花卉からギ酸-メタノール-水 (5：50：45) で抽出したアントシアニン (A) と精製青色色素 (B) の透析性について。

Iは透析直前のもの。IIは (A), (B) を4時間透析した時の写真。(A) は4時間で透析されているが (B) は透析されていないことがわかる。

### 2) 化学構造

#### A) アントシアニンの構造

上記精製方法に記載されたサルビア・ウリギノーサのアントシアニン精製標品につき、化学分析の結果、アントシアニン部分はデルフィニンジンであることが明らかになった。また、アントシアニンの酸加水分解により、遊離してくる糖は、ブドウ糖であ

った。吸収スペクトルからアシル基 (有機酸) の存在が予想され, アルカリ分解後, ジエチルエーテルで抽出し, p-クマール酸が結合していることを確認した。それぞれの構成要素がどのような結合をしているか, その立体構造をNMRを用いて明らかにしようとしていたところ, サルビア・ウリギノーサのアントシアニン構造につき発表がなされ, それはデルフィニジン-3-O- [6-O- (パラクマロイル) -β-D-グルコピラノシド] -5-O- [4-O-アセチル-6-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド] であり (Ishikawa et al., 1999), それはまた我々のそれまでのデータと一致するものであった (下図-5)。

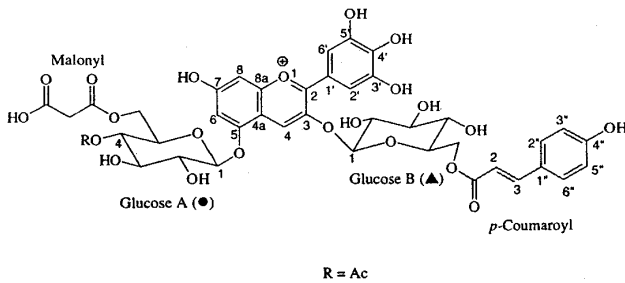
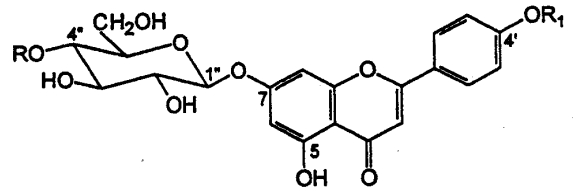


図-5 サルビア・ウリギノーサのアントシアニン。デルフィニジン-3-O- [6-O- (パラクマロイル) -β-D-グルコピラノシド] -5-O- [4-O-アセチル-6-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド] の化学構造。文献 (Ishikawa et al., 1999) より引用。

B) フラボンの構造

これまで知られている金属青色色素には, アントシアニン, 金属以外に必ず, フラボンがふくまれている。すなわち, ツユクサの場合, フラボンコンメリニン (Tamura et al., 1986) であり, ヤグルマギクの場合, アピゲニン 4'-マロニルグルコシド-7-グルクロニドであり (武田, 1988), サルビア・パテンスの場合, アピゲニン 7, 4'-O, O-ジグルコシド (II) であることが知られている (Takeda et al., 1994)。興味あることにこれらのフラボンの骨格をなしている構造はいずれもアピゲニンである。更に, 最近サルビア・ウリギノーサの中に上記 II の他に新たに, 二種類のアピゲニンセロピオシドの存在が発表された。すなわちアピゲニン 7-O-β-D-グルコピラノシール- (1'''→4'') -β-D-グルコピラノシド (I), アピゲニン 7-O-β-D-グルコピラノシール- (1'''→4'') -β-D-グルコピラノシド-4'-O-β-D-グルコピラノシド (III) である (Veitch et al., 1998) (図-6)。



	R	R <sub>1</sub>
I	β-D-glc	H
II	H	β-D-glc
III	β-D-glc	β-D-glc

図-6 サルビア・ウリギノーサに含まれるフラボン; アピゲニン誘導体 I, II, III の化学構造。文献 (Veitch et al., 1998) より引用。

アピゲニン誘導体の II がサルビア・パテンスのアントシアニンを青色化していることから, 当研究者は, サルビア・ウリギノーサの青色色素には, I, II, III, のどれかが含まれているのではないかと考え, Veitch 等の方法に従って, I, II, III を部分精製し, それを標準物質とし, 精製青色色素から分離されるフラボンと比較した。3種類のフラボンは BAW (ブタノール: 酢酸: 水=4: 1: 5), 15% 酢酸の展開液によるペーパークロマトグラフィーで下記のような R<sub>f</sub> 値を示すことから, それぞれを分離することができた。

	R <sub>f</sub> 値		
アピゲニン	I	II	III
BAW	0.23	0.22	0.08
15% 酢酸	0.15	0.50	0.48

一方, サルビア・ウリギノーサの精製青色色素からは, その水溶液に 10% トリフルオロ酢酸 (TFA) を加え, 解離させた後, ペーパークロマトグラフィー (BAW) を行い, 遊離してきたフラボンを比較検討した。紫外線を照射して発する蛍光の色調からそれはアピゲニンであった。またそのアピゲニンをメタノールにより溶出しスペクトルをとったところ, 268nm と 318nm にピークを示した (図7)。この結果は, 青色色素に含まれるフラボンが確かに Veitch 等が示したアピゲニン II 及びアピゲニン III と同じ吸収スペクトルであることを示している (Veitch et al., 1998)。

次にサルビア・ウリギノーサの精製青色色素由来のフラボンとサルビア・ウリギノーサ青色花卉から部分精製したアピゲニン I, II, III のペーパークロマトグラフィー上での移動度とを比較したところ, 精製青色色素由来のフラボンはアピゲニン III と移動度

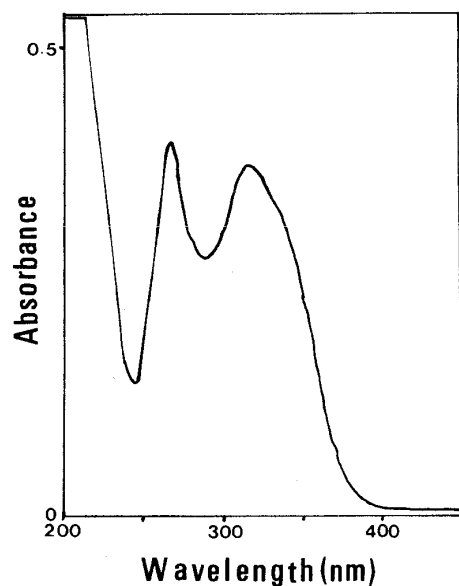


図-7 サルビア・ウリギノーサ精製青色色素に含まれるフラボンの吸収スペクトル。  
精製青色色素を10%トリフルオロ酢酸で解離し、ペーパークロマトグラフィーを行い、フラボンのバンドをメタノールで溶出し吸収スペクトルを測定した。318, 268nmに吸収極大が観察される。

が一致した(図-8)。このことから青色色素に含まれるフラボンはアピゲニン7-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル- $\beta$  (1''' $\rightarrow$ 4'') - $\beta$ -D-グルコピラノシド-4'-O- $\beta$ -D-グルコピラノシド (Ⅲ) であることが明らかとなった。

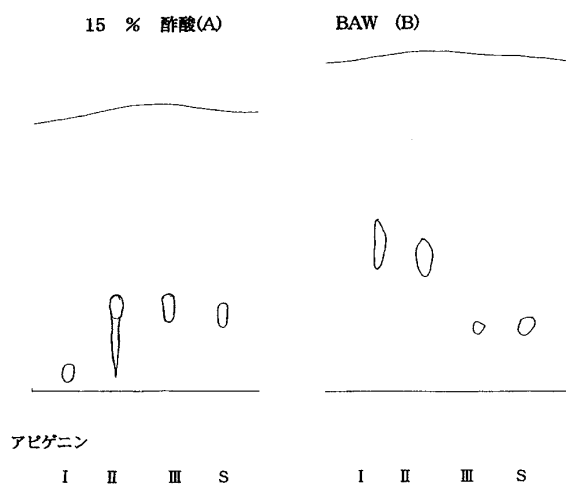


図-8 サルビア・ウリギノーサ精製青色色素に含まれるフラボン。  
アピゲニン誘導体 I, II, III を精製し、それぞれと青色色素由来のフラボンを、15%酢酸 (A)、BAW (ブタノール:酢酸:水 (4:1:5)) (B) のペーパークロマトグラフィーを行って展開パターンを比較した。S は青色色素に含まれるフラボンを示す。

### 3 精製青色色素がメタロアントシアニンである証拠

これまで報告されているメタロアントシアニンは640~660nmに吸収極大値を示す(齋藤, 1990)。サルビア・ウリギノーサの青色花卉からの抽出液及び精製青色色素の吸収スペクトルで644.8nmに吸収ピークが見られることから、金属の存在が予想されたので、原子吸光光度計 (Z-8000, Hitachi) を用いて精製青色色素の Fe, Mn, Al, Zn, Ca, Mg の存在と、量を測定した。測定の結果、Fe, Mn, Al, Zn, Ca は検出されなかったが、Mg の存在が確かめられ、青色色素1mg中には、2.8  $\mu$ g 含まれていた。このことは、青色色素の分子量を約8,000~10,000と仮定すると約1分子のMgがふくまれている計算になる。ツユクサの青色色素成分であるコンメリニンの場合、分子量が約9100と考えられており、Mgが約2分子含まれていると考えられているので (Tamura et al., 1986)、それとは異なる構造が示唆された。

### 考 察

本研究において、当研究者等はサルビア・ウリギノーサの青色花卉から初めて、その色素を精製した。そして、吸収スペクトル、及び元素分析により、Mgを含むメタロアントシアニンであることを明らかにした。また他の研究者の報告結果との比較検討の結果、アントシアニンはデルフィニジン-3-O-[6-O-(パラクマロイル)- $\beta$ -D-グルコピラノシド]-5-O-[4-O-アセチル-6-O-マロニル- $\beta$ -D-グルコピラノシド]であり、フラボン部分はアピゲニン7-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル- (1''' $\rightarrow$ 4'') - $\beta$ -D-グルコピラノシド-4'-O- $\beta$ -D-グルコピラノシド (Ⅲ) であることが明らかになった。これまで、メタロアントシアニンとして知られている青色花は、ツユクサ、ヤグルマギク (武田, 1988)、サルビア・パテンスのみであり、これに新たにサルビア・ウリギノーサの青色花が加わったことになる。メタロアントシアニンはアントシアニンの青色化に関する説として古くから提出されたモデルであるにも関わらず、それを実証する例は三例しか知られていなかったが、これに新たな青色色素が加わった意義は大きいと思われる。

今後は、青色色素の各構成要素から、再構成実験により、実際に青色色素が現れるかどうか、またサルビア・ウリギノーサの中に含まれるアピゲニンのIやIIでは、どの程度の青色化が起こるのかなどを調べていきたいと思っている。また、サルビアには他の青色花があるので、他に金属の関係しているものはないのか、などの研究を行いたいと考えている。

### 摘 要

サルビア・ウリギノーサの青色花卉色素の複合体をエタノール沈澱法, Sephadex LH20クロマトグラフィーにより精製した。青色色素は644.8, 586.8, 314.4nmに吸収極大を示した。精製青色色素はセロハン透析チューブを通さないことからかなり大きな分子複合体を形成していることが示された。精製色素の原子吸光分析の結果マグネシウムが検出され、鉄、マンガン、アルミニウム、カルシウム、亜鉛は検出されなかった。青色色素に含まれるアントシアニンデルフィニジン-3-O-[6-O-(パラクマロイル)- $\beta$ -D-グルコピラノシド]-5-O-[4-O-アセチル-6-O-マロニル- $\beta$ -D-グルコピラノシド]であり、フラボン部分はアピゲニン7-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1"  $\rightarrow$  4")- $\beta$ -D-グルコピラノシド-4'- $\beta$ -D-グルコピラノシド(Ⅲ)であり、マグネシウムを含むメタロアントシアニンであることが示唆された。本研究によりサルビア・ウリギノーサの青色色素が、ツユクサ、ヤグルマギク、サルビア・パテンスに継ぐ第四のメタロアントシアニンであることが明らかとなった。

### 謝 辞

本研究を行うに当たり、助言して頂いた東京学芸大学教授武田幸作先生に感謝致します。また研究費の補助をして頂いた財団法人私学研修福祉会、金属元素の分析に協力頂いた恵泉園芸短期大学助教授片倉芳雄氏にそれぞれ感謝します。

### 引用文献

- Hayashi, K. and H. Takeda 1970. Further purification and component analysis of commelinin showing the presence of magnesium in this blue complex molecule. Proc. Japan Acad., 46:535-540.
- 本多利雄・齋藤規夫. 1998. 花の色の科学 — 多様な色をつくり出すアントシアニン. 現代化学. 25-32.
- Ishikawa, T., T. Kondo, T. Kinoshita, H. Haruyama, S. Inaba, K. Takeda, R. J. Grayer and N. C. Veitch. 1999. An acetylated anthocyanin from the blue petals of *Salvia uliginosa*. Phytochemistry 52:517-521.
- 齋藤規夫. 1990. 青色花の色素と花色の安定化. バイオホルティ2. 誠文堂新光社, 49-59

武田幸作. 1988. 最近の色素実験法及び研究の発展. 植物色素 (林孝三編) 養賢堂, 東京: 464-479.

Takeda, K., M. Yanagisawa, T. Kifune, T. Kinoshita and C. F. Timberlake. 1994. A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*. Phytochemistry 35:1167-1169.

Tamura, H., T. Kondo and T. Goto. 1986. The composition of commelinin, A highly associated metalloanthocyanin present in the blue flowers of *Commelina communis*. Tetrahedron Lett., 27:1801-1804.

Veitch, N. C., R. J. Grayer, J. L. Irwin, and K. Takeda. 1998. Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*. Phytochemistry 48:389-393.