

白色パンジー花抽出液は赤紫色ハナショウブ花抽出液を青色化する

水永武光, 大屋理恵, 滝本桂子, 村上睦朗

White Pansy Petal Extract has a Bluing Effect on the Color of the Red-Purple *Iris ensata* Thunb Petal Extract

Takemitsu MIZUNAGA, Rie OHYA, Keiko TAKIMOTO, Mutsuo MURAKAMI

Summary

In order to obtain more information about the bluing effect of co-pigments on anthocyanins, we studied combinations which brought about the color changes in various red to red-purple flower petals. Extracts of these petals, which contain typical anthocyanins such as pelargonin, cyanin, peonin, delphin, petunin, and malvin, were mixed with extracts from various white flower petals. As a result, a bluing effect was observed when the extract of red purple *Iris ensata* Thunb was mixed with an extract from a white pansy. The extract of white pansy was fractionated by polyamide C-100 chromatography and almost all of the bluing activity was eluted by 0.3N~1.1N hydrochloric acid. This fraction shifted the maximum absorption spectrum of the extract of red-purple *Iris ensata* Thunb (λ_{\max} =533nm) to 561 nm and 630 nm just after the mixing, and to 581 nm and 630 after a one day incubation.

緒言

我々の世界は多種多様な色彩であふれており、我々の目を楽しませてくれる。その中でも花の色は一際目立って美しく、人間の生活を豊かにしてくれる。鮮やかな色彩を誇る花壇の花や華麗な花束でなくても、一輪の淡い野の花があるだけで、うるおいを与えてくれる。

花の色素のうち、赤、紫、青系統の鮮やかな色は、主としてアントシアニンによる。クロロフィルやカロチノイドが、それぞれ、緑、橙色系統の狭い範囲の色調なのに対し、アントシアニン色素は橙から青にいたる広い範囲の色を発現する。さらに、同じ色素が、バラの花弁では赤色を示し、ヤグルマギクの花弁中では青色を示すことや、アジサイの花が、色素成分は同一のアントシアニンであるにもかかわらず、赤、紫、青の色を呈色する現象も、アントシアニンの不思議の一つである。

これまでの花色研究の中で青色花色の研究は生物学者や化学者の興味を引いてきた。アントシアニンは溶液のpH変化にきわめて敏感に反応し、酸性側で赤色、中性付近で紫色、アルカリ側で青色へと連続的に幅広く色に変化するが、花弁の細胞液は弱酸

性 (pH3.5~6.0) であることから、どうして青色の花が存在するのかに大きな関心が向けられてきたのである。

代表的な青色花である、ツユクサ (tamura et al.,1986) .ヤグルマギク (Kondo et al., 1994), サルビアの一種, *Salvia Patens*については金属錯体であること (Takeda et al.,1994) が示されてきた (メタロアントシアニン)。

一方、中性溶液中で一般のアントシアニンと違って極めて安定なアントシアニンがキキョウの青紫色花から単離されて (Saito et al.,1972) 以来、シネラニア (Yoshitama et al.,1975), 西洋アサガオ (ヘブンリーブルー) (Asen et al.,1977), リンドウ (Goto et al.,1982) などの青紫色~青色花からも同様なアントシアニンがあいついで単離され、その構造が明らかにされた。その結果、これらのアントシアニンは分子中に多数の芳香族有機酸を含むポリアシル化色素で、側鎖に結合しているカフェー酸やパラクマール酸が色素とスタッキング状に芳香族同士で重なるような構造をとることにより、青色化効果が生じると考えられている (分子内コピグメント)。

他方、アントシアニンが植物体中に存在する無色の物質フラボン、タンニン、ポリフェノール、芳香族有機酸などの芳香族化合物と分子間相互作用をし安定化、深色化する例も報告されている（分子間コピグメント）。

コピグメントによる青色花の例として、青色化アイリス (Asen et al., 1970), 紫青色花フクシア (Yazaki and Hayashi, 1967), などが知られている。しかし、これらの知見は主として同一花からの花色素のアミルコール抽出による赤色化, アミルアルコール抽出物質添加による青色化の現象による。

当研究者等は赤～赤紫系花の抽出液に種々の白色花の抽出液を加えることにより、青色化する物質を検索することにより、アントシアニンを青色化する因子を幅広く見出すことを試みた。

実験材料および方法

花材：赤紫色ハナショウブ (*Iris ensata* Thunb), 桃色アジサイ (*Hydrangea macrophylla*), 赤橙色ゼラニウム (*Pelargonium hotorum.*), 青紫色ペチュニア (*Petunia hybrida*), 西洋アサガオ (*Ipomea tricolor* cav.), 白色系花卉；キンギョソウ (*Antirrhinum majus*), ゼラニウム (*Pelargonium hotorum*), パンジー (*Viola x wittrochiana*, “New Crystal White”), バラ (*Rosa hybrida* Hort.) は園芸生活学科キャンパスに栽培しているものを用いた。赤色バラ “Rote Rosa” は佐野バラ園より入手した。花卉は使用時まで - 80°C で冷凍保存した。

花卉からの色素及び白色花卉からの青色化因子の抽出方法：花卉 1g に対し 4ml の 4M NaCl を加え 4°C に一晩浸す。石英砂を約 0.5g 加え乳鉢でよく磨砕する。磨砕液をエッペンドルフチューブに入れクボタ遠心分離機 (KM-15200) により、10000 回転、5 分の上澄みを抽出液とした。白色パンジー抽出液中の成分をカラムクロマトグラフィーにより分離する場合は、花卉 20g に対し、40ml の水を加え乳鉢中で同じように抽出し、トミー遠心分離機 (RS-206) により、10000 回転、10 分の上澄みを用いた。

吸収スペクトル：日立分光高度計 U-3200 を用いた。

ポリアミド C-100 カラムクロマトグラフィー：ポリアミド C-100 (和光) 40g を純水に懸濁しカラム (3.0 × 30cm) につめる。水 (200ml), 水～100% メタノールの直線的濃度勾配 (各 150ml) 系, 0.3N 塩酸～1.1N 塩酸の直線的濃度勾配 (各 75ml) 系で溶出した。試験管一本あたり 10ml ずつ集めた。溶出パターンは 371.8nm の吸光度により測定した。

結 果

1. 赤～赤紫系統花抽出液に対する種々の白色花抽出液の影響について

赤～赤紫系統の花弁で、ペラルゴニン, シアニン, ペオニン, デルフィン, ペチュニン, マルビンのアントシアニンを含むと考えられている, 代表的な花卉の 4M NaCl 抽出液 (それぞれ, 赤橙色サルビア, 赤バラ “ローテローザ”, 西洋アサガオ, 赤紫色アジサイ, 青紫色ペチュニア, 赤紫色ハナショウブ) (林, 1988) に種々の白色花 4M NaCl 抽出液を加えることにより, 青色化する白色花を検索した。白色花はゼラニウム, キンギョソウ, パンジー, バラを用いた。青色化因子は赤～青紫系花卉抽出液の吸収スペクトルを長波長側に移行させる効果で判定した。

その結果, 表 1 に示す如く, 白色パンジーの抽出液が赤紫色ハナショウブ花卉抽出液の最大吸収波長を長波長側に移行させ, 青色化した (図-1)。バラ, アジサイ, ゼラニウム, ペチュニア, 花卉抽出液では, 白色パンジー抽出液による青色化効果は特に観察されなかった (data not shown)。

表-1 赤紫色ハナショウブ花卉抽出液に対する種々の白色花卉抽出液の影響

	最大吸収波長 (nm)
赤紫ハナショウブ	526.6
赤紫色ハナショウブ + 白色ゼラニウム	532.6
+ 白色キンギョソウ	532.8
+ 白色バラ	539.2
+ 白色パンジー	572.0, 630.0

赤紫色花ハナショウブの 4M NaCl 抽出液に各白色花 4M NaCl 抽出液を 2 倍量加えたときの吸収スペクトルの最大吸収波長を示した。

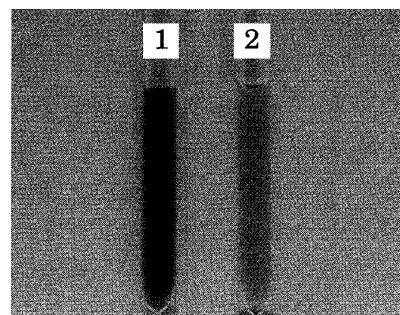


図-1 赤紫色ハナショウブ花卉 4M NaCl 抽出液に対する白色パンジー花卉 4M NaCl 抽出液の影響

1. 赤紫色ハナショウブ 4M NaCl 抽出液に 4M NaCl を 2 倍量加えたもの
2. 赤紫色ハナショウブ 4M NaCl 抽出液に白色パンジー 4M NaCl 抽出液を 2 倍量加えたもの

2. ポリアミドC-100カラムクロマトグラフィーによる白色パンジー抽出液中の青色化因子の検索

白色パンジー抽出液の中には多くの有機物や無機物が含まれており、その中のどの因子が赤紫色ハナショウブ抽出液を青色化したかを明らかにする為にポリアミドC-100カラムクロマトグラフィーを行った。溶媒は水～メタノール系、0.3N～1.1N塩酸の濃度勾配によった。

溶出パターンは371.8nmの吸光度によった。アントシアニンの青色化因子として一般的にフラボン類が助色素として関与することが知られており、白色パンジー抽出液の中にはフラボン類の一種ケルセチンが存在する事が知られているからである(石川等 1995)。

青色化の活性は次のようにして調べた。水～メタノール系溶出の画分はロータリーエバポレーターで蒸発後4M NaClに溶解した溶液を、塩酸の濃度勾配で溶出した画分は1N NaOHでpHを7.0に調整したあとNaClを4M相当加え、アントシアニン溶液と混合しハナショウブ抽出液の最大吸収波長を長波長側に移行させる活性で調べた。

各画分について青色効果を調べた結果を図-2に示す。試験管番号10, 51～62にその効果(活性)が示された。

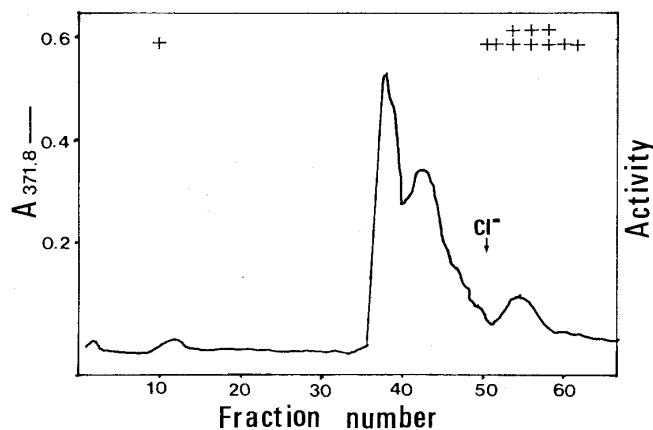


図-2 白色パンジー抽出液のポリアミドC-100カラムクロマトグラフィー

白色パンジー抽出液30mlをポリアミドC-100のカラム(3.0x30cm)にかけ、水(200ml)、水～メタノールの直線的濃度勾配(各150ml)、0.3N～1.1N塩酸の直線的濃度勾配(各75ml)で溶出した。各10mlを分画した。

A371.8nmの吸光度はフラボンの一種ケルセチンの吸光度を、活性(+)は青色化活性を示す。↓印はCl⁻検出の位置を示し、51本目より出現した。

3. ポリアミドC-100クロマトグラフィーにおける塩酸溶出画分の青色化の特徴

大部分の活性が画分51～62であったことから、この画分についてその性質を更に詳しく調べた。図-3に示すごとく、青色化は赤紫色ハナショウブ抽出液(最大吸収波長 λ max=533nm)と混合した直後(λ max=561nm, 630nm)よりも、一日放置後、安定化したもの(λ max=580nm, 630nm)が、青色化が強く表れていることが分かった。図から、安定化したものでは561nmのpeakが580nmにシフトしていることが示された。

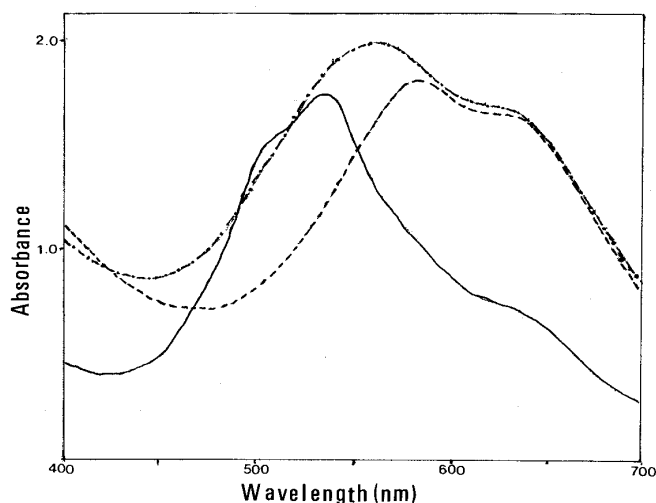


図-3 白色パンジー抽出液のポリアミドC-100カラムクロマトグラフィーによる塩酸溶出画分青色化の特徴

白色パンジー抽出液のポリアミドC-100カラムクロマトグラフィーによる塩酸溶出画分をNaOHで中和後赤紫花ハナショウブ抽出液と混合後400～700nmの吸収スペクトルを測定した。—; 赤紫色ハナショウブ抽出液, -.-.; 塩酸溶出画分との混合直後の吸収スペクトル。----; 塩酸溶出画分と混合後、一日後に測定したもの。

4. 種々の赤～赤紫色花卉抽出液に対する白色パンジー抽出液のポリアミドC-100クロマトグラフィー塩酸溶出画分の影響

ハナショウブ、ゼラニウム、バラ、アジサイ、ペチュニア抽出液にポリアミドC-100クロマトグラフィー塩酸溶出画分を加えその効果を調べた。バラ、ペチュニア、アジサイを含む花卉抽出液にもわずかながら青色化は観察されたが、すぐに変色してしまい、ハナショウブのような鮮やかな青色にはならなかった。従って白色パンジーにはハナショウブ抽出液を特異的に青色化する物質が含まれていると考えられる(図-4)。

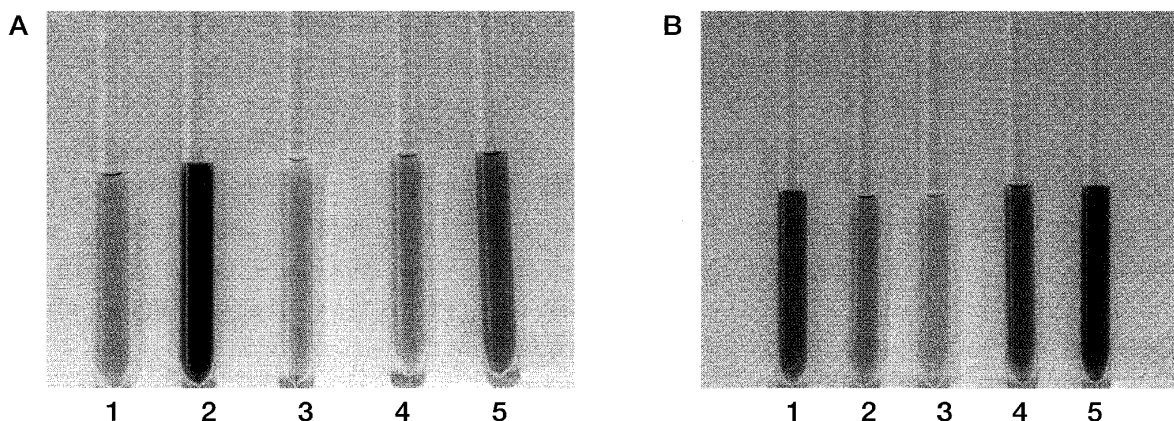


図-4 白色パンジー抽出液のポリアミドC-100カラムクロマトグラフィー塩酸溶出画分の種々の赤～赤紫色花卉抽出液に対する影響

A) 種々の花卉抽出液

B) 種々の花卉抽出液にポリアミドC-100 塩酸溶出画分を添加したもの

1. ハナショウブ, 2. ゼラニウム, 3. バラ, 4. アジサイ, 5. ペチュニア

考 察

アントシアニンの青色発現については緒言で記したように、現在のところ三つのモデルがあるが、本研究においては、アントシアニンと相互作用することにより、赤～赤紫色花卉の抽出液を青色化する物質を白色花卉中に検索することを目的とした。その結果、赤紫色ハナショウブ抽出液に白色パンジーの抽出液を加えたときに特異的に青色化が起ることを私達は発見した。これまで、アントシアニンと相互作用して青色化する物質は有機物質としては、フラボンやフラボノール、カフェー酸、パラクマール酸などの芳香族有機酸、無機物質としては、Fe, Mg, Alなどが知られている。そこで、植物中のフラボンやフラボノールの分離によく用いられるポリアミドC-100のカラムクロマトグラフィーを行って赤紫色ハナショウブ抽出液を青色化する因子の分画を試みた。

水～メタノール系で溶出される画分にもわずかながら赤紫色ハナショウブ抽出液を青色化する物質が検出されたが、大部分の青色化活性は塩酸の濃度勾配で溶出される画分に見い出された。このことから青色化因子は無機物質(金属)の可能性が考えられるが、どのような物質であるか、今後の検討が待たれる。

ポリアミドC-100クロマトグラフィーからの塩酸溶出画分による青色化効果では、最大吸収スペクトルの長波長側への移行と吸収値の増大が見られた。この効果はRobinson夫妻の提唱したコピグメント効果(Robinson and Robinson, 1931)に相当する。

赤紫色ハナショウブ抽出液中には、アントシアニンとそれ以外に青色化に関係している物質が含まれている可能性があるが、それらと白色パンジー中の青色化物質(コピグメント)との相互作用の分子的理解は花色の青色化発現機構に新たな知見を加えるものと考えられる。

摘 要

アントシアニンによる青色化発現についての、より広い知見を得るために代表的なアントシアニンであるペラルゴニン、シアニン、ペオニン、デルフィン、ペチュニン、マルビンを含むと報告されている種々の赤～赤紫色花卉の抽出液に種々の白色花卉抽出液を加えることにより、青色化する組み合わせを検索した。その結果、赤紫色ハナショウブ抽出液に白色パンジー抽出液を混合したときに青色化することを見い出した。白色パンジー抽出液のポリアミドC-100クロマトグラフィーにより大部分の青色化活性は塩酸で溶出される画分に見い出された。この画分は赤紫色ハナショウブ抽出液の最大吸収波長 $\lambda_{max}=533\text{nm}$ を 561nm と 630nm に移行させ、また一日放置後には 580nm と 630nm のピークを出現させた。

引用文献

- Asen, S., R.N. Stewart, K. H. Norris and D. R. Massie. 1970. A stable blue non-metallic co-pigment complex of delphinin and C-glycosyflavones in *Prof. Blaauw Iris*. *Phytochemistry* 9: 619-627.
- Asen, S., R.N. Stewart and K. H. Norris,

1977. Anthocyanin and pH involved in the color of 'Heavenly Blue' morning glory. *Phytochemistry*, 16 : 1118-1119.
- 石川理津子, 小林咲子, 中島教子. 1995. ヤグルマギクの青色発現に関係するアントキサンチンの調査. 恵泉女学園短期大学卒業論文. 1-31
- Goto, T., T. Kondo., H. Tamura, H. Imagawa, A. Iino and K. Takeda. 1982. Structure of gentiodelphin, an acylated anthocyanin isolated from *Gentiana Makinoi*, that is stable in dilute aqueous solution. *Tetrahedron Lett.* 23 : 3695-3698.
- 林幸三, 1988. 色素群の定性 定量分析各論, 植物色素. 160
- Kondo, T., M. Ueda, H. Tamura, K. Yoshida, M. Isobe and T. Goto. 1994. Composition of protocyanin, A self-assembled supramolecular pigment from the blue cornflower, *Centaurea cyanus*. *Angew. Chem. Int. Engl.* 33 : 978-979.
- Robinson, G. M. and R. Robinson. 1931. A survey of anthocyanins I. *Biochem. J.* 25 : 1687-1705.
- Saito, N., Y. Osawa and K. Hayashi. 1972. Isolation of a blue-violet pigment from the flowers of *Platycodon grandiflorum*. *Bot. Mag. Tokyo*, 85: 105-110.
- 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 flower petals of *Commelina communis*. *Tetrahedron Lett.*, 27 : 1801-1804.
- Yazaki, Y. and K. Hayashi. 1967. Analysis of flower colors in *Fuchsia hybrida* in reference to the concept of co-pigmentation. *Proc. Japan Acad.*, 43 : 316-321.
- Yoshitama, K., K. Hayashi, K. Abe and H. Kakisawa. 1975. Further evidence for the glycoside structure of cinerarin. *Bot. Mag. Tokyo* 88 : 213-217.