

## 9141 アントシアニン系色素の塩による安定化

吉田 久美(椋山女学園大学)

アントシアニンは一般的に不安定であるが、赤シソのアントシアニンを用いて着色した梅干し漬けでは、長期間安定に色を保つ。昨年度までの研究により、この理由が梅に含まれる有機酸によって液性が強酸性になることと、漬けるときに用いる高濃度の食塩によるものであることが明らかにできた。

そこで、本年度は、赤シソから単離精製した純粋なマロニルシソニン、シソニンを用いて、食塩ばかりでなく、他の1価および2価、3価の塩(塩化ナトリウム、塩化リチウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化第2鉄、塩化アルミニウム)のアントシアニンの安定性に及ぼす効果を調べた。

色素( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ )を各種pH(pH 2~8)、濃度( $5 \times 10^{-4} \sim 4 \text{M}$ )の塩溶液に溶解し、その溶液の電子スペクトルの経時変化を測定した。

1価の塩はいずれのpHにおいても塩濃度が高いほど色は安定であったが、その効果はさほど強くないことが明らかになった。2価の塩では、pH 4、6の弱酸性および中性域において、可視の吸収極大波長の長波長シフトが認められ、さらに、いずれのpHにおいても極めて高い安定化効果が認められた。3価の塩では1M以上の高濃度での試験が塩の溶解性が低いため不可能であり、中性域における若干の長波長シフト効果があったものの安定化効果は認められなかった(表)。

さらに、各種塩溶液の $^{17}\text{O}$  NMRスペクトルを測定し、塩溶液の水の運動性を測定したところ、水の $^{17}\text{O}$ シグナルの半値幅と塩の安定化効果との間に定性的ながらも相関関係が認められた。したがって、高濃度の塩溶液中でアントシアニンの色が安定化される理由は、系内の自由水が減少し、プソイド塩基への水和反応が抑制されるためであることがわかった。

Table. Stability and color change of malonylshisonin in various salts solutions.

Salt	$\lambda_{\text{vismax}}$	Stability (relative absorbance at $\lambda_{\text{vismax}}$ after 4h)
no salts	560 nm	0%
4 M NaCl	560 nm	17%
4 M $\text{MgCl}_2$	607 nm	95%
4 M $\text{CaCl}_2$	585 nm	76%



9141 アントシアニン系色素の塩による安定化

吉田 久美 (相山女学園大学)

1. はじめに

美しい花や鮮やかな果実、野菜の赤から紫、青にいたる色は、ほとんどがアントシアニンによる<sup>1)</sup>。色調が極めて美しく、さらに、取り得る色の幅が広いという利点を持つ。さらに、人類が長年にわたり食してきた食用植物にも多く含まれることから、安全性にも何ら問題がない。これらの理由からアントシアニンは、発癌性、肝毒性などが懸念される合成タール系着色料に替わる食用着色料として大きな期待が寄せられている。実際に、消費者の自然指向もあって、最近の清涼飲料水などは、赤キャベツや、ブドウなどのアントシアニン系色素が多く使用されている。しかし、

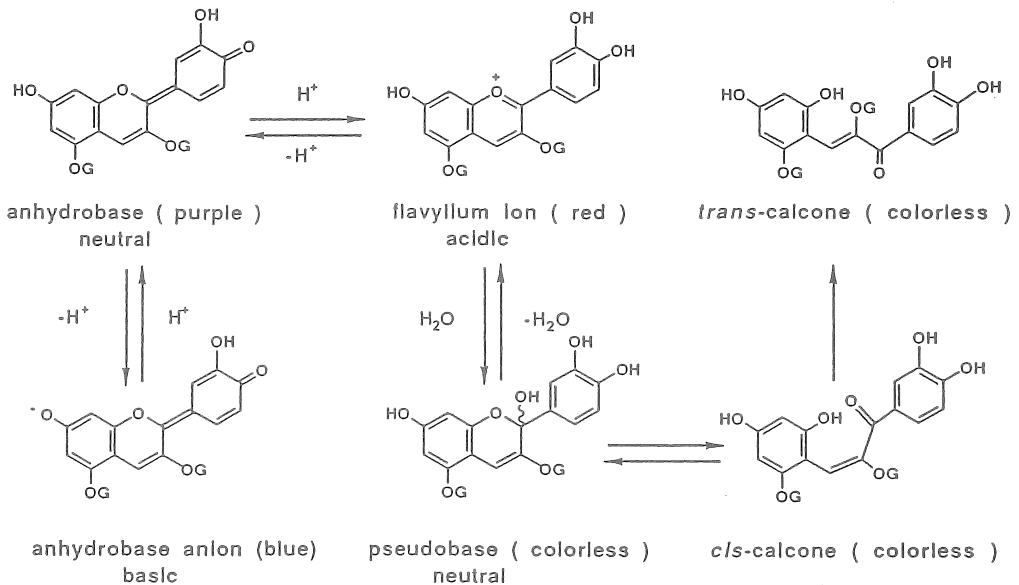


Fig. 1 Structural change of anthocyanin with pH in aqueous solutions.

アントシアニンは、図1に示すように中性希薄溶液中では速やかにプソイド塩基へと退色し、さらに、経時的にトランスカルコンへと不可逆的に分解する。光に対しては比較的安定であるが、加熱に対しては不安定で、容易に調理、食品加工時に分解するので現在のところその利用は極めて限られている。

我々は、昨年度の当財団の助成による研究によって、梅干し漬けの赤色がシソに含まれるアントシアニンによるものであるにもかかわらず、長期間安定に色を保つ理由について化学的に研究し、梅を漬けるときに用いる多量の食塩と梅から滲出する有機酸による強酸性の両方によって色素が安定化されていることを明らかにした<sup>2)</sup>。

本研究では、まず最初に食塩以外の他の無機塩にも同様の安定化作用があるかどうかシソから単離した色素<sup>3)</sup> (図2) を用いて調べた。用いた無機塩は、将来食用着色料として応用することをふまえ、毒性の懸念される重金属塩は除外した。1価の塩としては、塩化ナトリウム以外に、高血圧用の減塩調味料に用いられる塩化カリウム、および同族の塩化リチウムを、2価の塩としては、食塩の不純物、いわゆるニガリ成分の塩化マグネシウムと塩化カルシウムを、3価の塩としては、塩化鉄と塩化アルミニウムを選んだ。次に、構造の異なるさまざまなアントシアニンを用

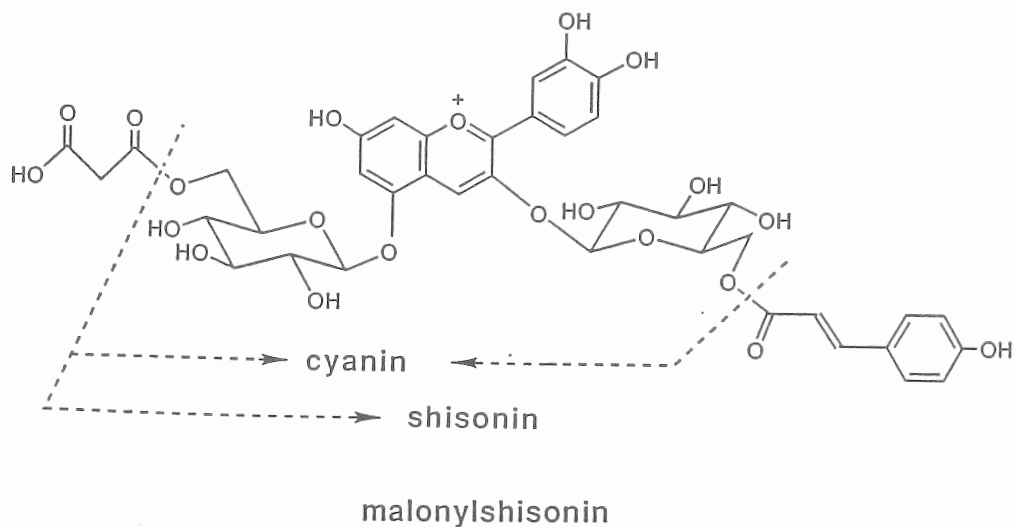


Fig. 2 Structures of malonylshisonin, shisonin and cyanin.

い、同様に安定化作用の違いについて調べた。さらに、無機塩のアントシアニン安定化効果がいかなる機構に基づくものかを明らかにするために、 $^{17}\text{O}$ 核磁気共鳴スペクトルを測定し、塩濃度と系内の自由水との関係を明らかにした。

## 2. 赤シソ色素の色および安定性に及ぼす無機塩の効果

アントシアニンが溶液の液性によって、ちょうどリトマスのように色を変化させることはよく知られている。1915年に Willstätter はこれらの観察から花の色の違いに対して pH 説を提出している<sup>4)</sup>。しかし、これに対して、日本の柴田桂太、柴田雄次らは1919年に金属錯体説を提出し、アントシアニンは金属錯体を形成することにより、青色を呈すると報告した<sup>5)</sup>。1960年に Bayer らは、鉄、アルミニウムなどはアントシアニンと青色の錯体を生成するが、マグネシウムでは、青色錯体を生成しないと主張し<sup>6)</sup>、柴田らの金属錯体説、その後の林らのツクサ青色花弁色素コンメリニンの推定構造<sup>7)</sup>（マグネシウムとフラボンを含む金属錯体アントシアニン）は否定され続けた。我々は、まず、アントシアニンの水溶液に無機塩を加え、溶液の色が変化するかどうかについて調べた。

### 2. 1 無機塩によるマロニルシソニン溶液の色の变化

マロニルシソニン<sup>3a)</sup>を pH 6 のリン酸緩衝液に  $5 \times 10^{-5}\text{M}$  の濃度に溶解し、100 当量 ( $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ) さらには、20、000 当量 (1 M) の無機塩を加え電子スペクトルを測定した。表に示すように、マロニルシソニンは緩衝液中では 542 nm に可視の吸収極大を示し、溶液の色は紫色を呈した。100 当量の添加では、ほとんど色の变化は認められず、わずかに 3 価の塩の塩化鉄のみ 7 nm 程度の長波長シフトを認めた。しかし、1 M の塩を添加すると、1 価の塩では効果はなかったが、2 価の塩化マグネシウム、塩化カルシウムにおいて可視の吸収極大の 40 nm もの長波長シフトが認められ、溶液はほとんど青色となった。3 価の無機塩は、pH 6 では溶解性が低く、1 M 濃度での実験は不可能であった。アントシアニンは中性条件下で 2 価、3 価の金属イオンが共存することにより、その吸収スペクトルが長波長シフトすることが明らかになった。これは、多分、アントシアニン B 環上のオルトジヒドロキシ基に金属が配位したためと考えられる<sup>8)</sup>。

なお、酸性条件のpH 2では、1価、2価、3価いずれの塩を共存させても、電子スペクトルには全く変化が認められなかった。pH 8の塩基性条件下でも、同様に無機塩による効果は認められなかった。これは、強酸性や、アルカリ性条件下では、アントシアニンがそれぞれ、フラビリウムイオン型およびアンヒドロ塩基型に固定されるためではないかと考えられた。

Table.  $\lambda_{vismax}$  (nm) of malonylshisonin ( $5 \times 10^{-5}M$ ) in various salt solutions at pH 6.

		Conc. of salt	
		100 eq. ( $5 \times 10^{-3}M$ )	1M
buffer	542	-	-
NaCl	-	542	548
LiCl	-	542	543
KCl	-	542	546
MgCl <sub>2</sub>	-	541	581
CaCl <sub>2</sub>	-	542	583
FeCl <sub>3</sub>	-	549	-
AlCl <sub>3</sub>	-	543	-

## 2. 2 無機塩によるシソニン溶液の安定化

梅干しは通常、梅の重量の20%程度の食塩を用いて塩漬けし、白梅酢が滲出してきたら、赤シソを加え着色する。白梅酢のpHは2前後、塩濃度は約4Mとなる。そこでまずpH 2における食塩の安定化効果について調べた。酸性溶液でアントシアニンは元来安定である。そこで、本実験においては分解を加速させるために温度を80°Cとし、また、色素としては、分子内のマロニル基の脱離による系の複雑化を避けるために、赤シソ葉の主色素マロニルシソニンでなく、シソニンを用いた。

シソニンを0~4Mの塩化ナトリウム水溶液に $5 \times 10^{-5}M$ の濃度に溶解し、pHを2に調整した。この溶液を80°Cに加熱し、経時的に電子スペクトルを測定し、可視の吸収極大波長における吸光度の変化として安定性を調べた(図3)。溶液の赤色は非常に安定で、塩濃度に依存して、その差は極めて小さいものの色が安定化される傾向が認められた。さらに、4Mの塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リ

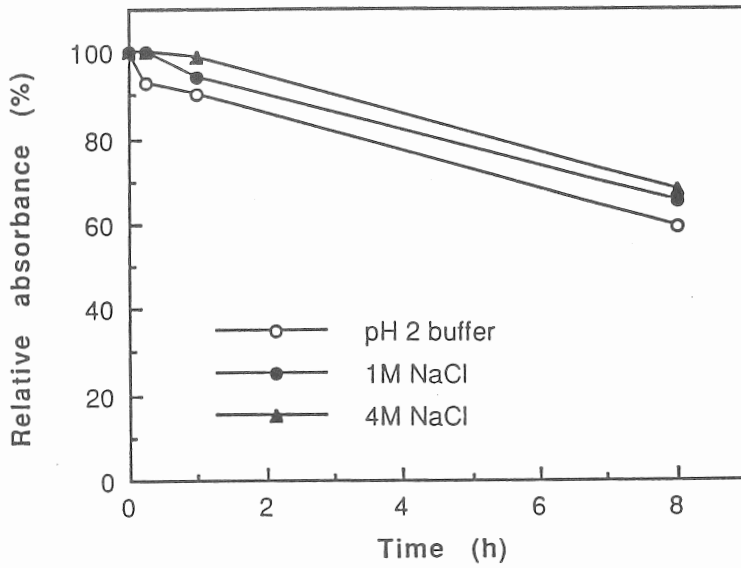


Fig. 3 Color stability of shisonin in NaCl solutions ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ , pH 2.0,  $80^\circ \text{C}$ ).

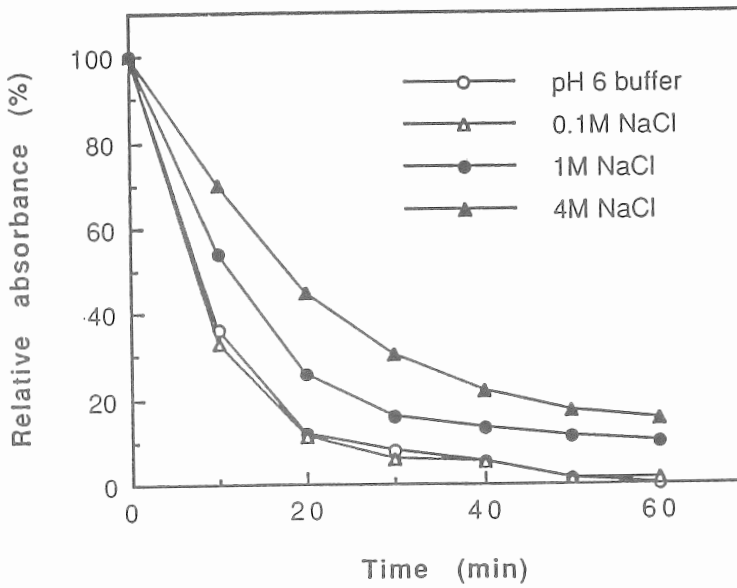


Fig. 4 Color stability of shisonin in NaCl solutions ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ , pH 6.0,  $20^\circ \text{C}$ ).

チウム、塩化マグネシウムの pH 2 におけるシソニン溶液の色の安定化作用について比較したところ、いずれも安定で、塩の種類による差はほとんど認められなかった。

次に、シソニンを pH 6 の溶液に溶かし、同様に無機塩を加えて安定化効果について検討した。pH 6 でアントシアニンは速やかに退色するため、室温で経時変化を調べた (図 4)。0.1 M の塩化ナトリウム添加では効果は全く認められなかったが、1 M の添加により若干安定化され、4 M 加えるとさらに安定になることが明らかにできた。以上から、塩化ナトリウムがアントシアニン溶液の色を濃度依存的に安定化することが確かめられた。次に、塩化ナトリウム以外の無機塩についても同様にシソニンを用いて安定化効果を調べた (図 5)。1 価の塩のうち、塩化カリウムは塩化ナトリウムとほぼ同程度の効果しか示さなかったが、塩化リチウムにはより強い安定化効果が認められた。2 価の塩である塩化マグネシウムには、極めて強くアントシアニン溶液の色を安定化する効果が認められ、1 M の塩化マグネシウムにより、1 時間後も 90% 程度の色が残存した。4 M 添加した場合には、1 時間後も退色はほとんど認められず、この溶液の青色は、1 日後もほとんどそのまま保たれた。

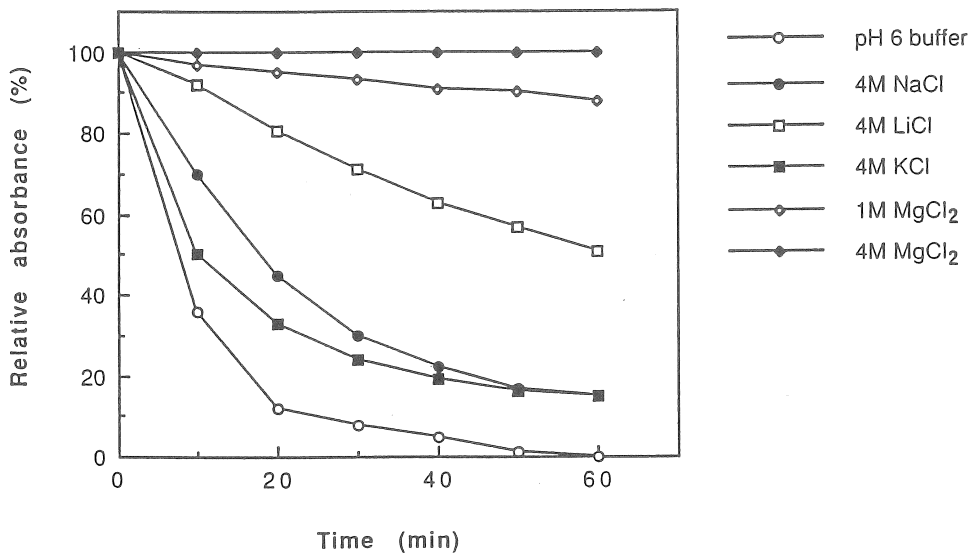


Fig. 5 Color stability of shisonin in various salt solutions ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ , pH 6.0,  $20^\circ \text{C}$ ).



### 3. 構造の異なるアントシアニンの塩化マグネシウムによる安定化

2. 2でさまざまな塩がシソニン溶液の色の安定化に寄与することが明らかになりました。そこで、シソニン以外のアントシアニンについて、安定化効果の最も強かった塩化マグネシウムを加えたときの安定性を調べた。アントシアニンとしては、いずれも赤シソに含まれるアントシアニンで、分子内の有機酸の数が0個と2個のシアニン、マロニルシソニンを選んだ。さらに、通常のアントシアニンと違い、中性の希薄溶液中でも極めて安定なアントシアニンである、ゲンチオデルフィン<sup>9)</sup>（図6、分子内に2個のコーヒー酸を有し、これらの分子内会合によって安定化される）も実験に加えた。これら3種のアントシアニンを1Mの塩化マグネシウム水溶液に $5 \times 10^{-5}$ Mの濃度で溶解し、pHを6に調整後40°Cで安定性を調べた（図7）。塩化マグネシウムを含まない緩衝液中でシアニン、マロニルシソニンは非常に不安定で、30分以内に退色したが、ゲンチオデルフィンは安定で、1時間後も90%程度の色が残存した。これらの溶液の色に対する塩化マグネシウムの安定化効果はめざましく、いずれの色素に対しても強い効果が認められた。シアニンでは1時間後も40%の色が保たれ、マロニルシソニンにおいては、塩を加えないときのゲンチオデルフィンよりもさらに安定になった。ゲンチオデルフィンでは、24時間後もほとんど溶解直後と同程度の濃い色が保たれた。

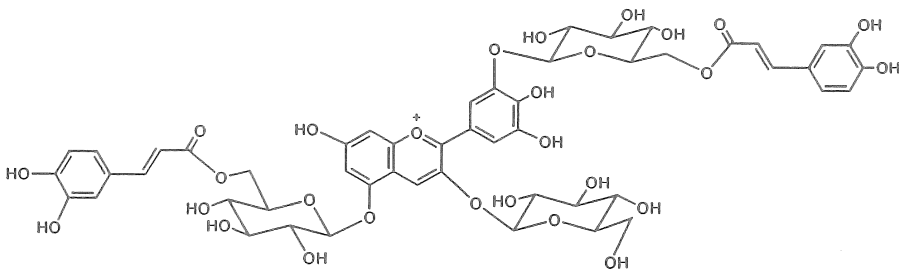


Fig. 6 Structure of gentiodelphin from *Gentiana makinoi*.

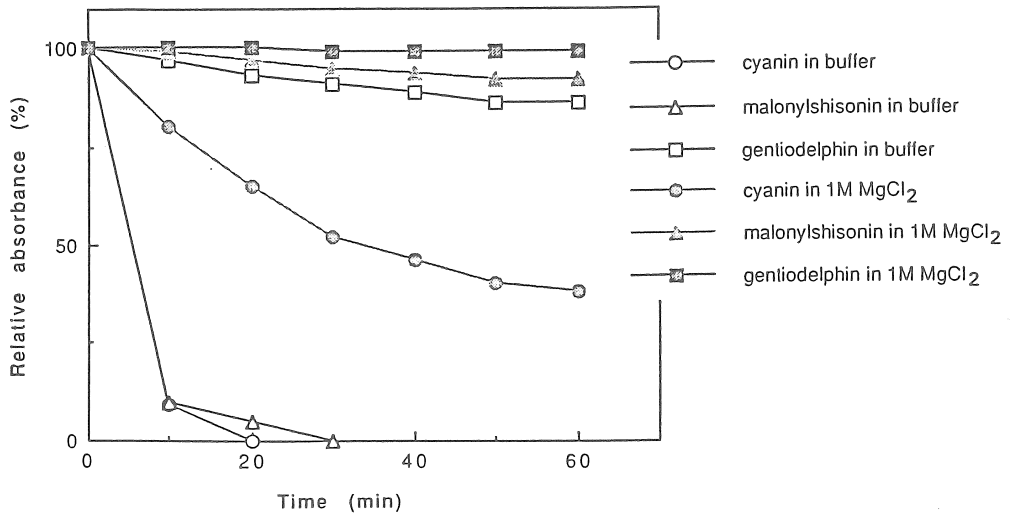


Fig. 7 Color stability of anthocyanins in 1M MgCl<sub>2</sub> (5x10<sup>-5</sup>M, pH 6.0 40°C).

#### 4. 塩溶液の<sup>17</sup>O核磁気共鳴スペクトルの測定

無機塩の種類によってアントシアニンの安定化効果が異なることは非常に興味深い。そこで、この違いが何によるものであるかを検討した。アントシアニンの中性域における退色は、アントシアニン環2位への水和によるプソイド塩基の生成によるものであることが明らかになっている。したがって、水の運動性を低下させれば、この退色反応を妨げることができるはずである。水の運動性と極めて密接に関連する<sup>17</sup>O核磁気共鳴スペクトル(<sup>17</sup>O NMR)を測定した。

各種の無機塩を4Mの濃度で2回蒸留水に溶解しメンブレンフィルターで濾過後内径10mmのチューブにサンプリングした。水分子の<sup>17</sup>Oスペクトルを、<sup>1</sup>H完全デカップリング条件下40°Cで測定し(<sup>17</sup>O: 36.58MHz)、シグナルの半値幅を求めた(図8)。その結果、安定化効果の高い塩ほど半値幅がひろいことが明らかになった。水の運動性が低いほど<sup>17</sup>Oシグナルのシグナル幅は広がることがわかっており<sup>10)</sup>、このことから、高濃度の塩のアントシアニン安定化効果は、無機塩が系内の水の運動性を低下させるためであることが明らかになった。

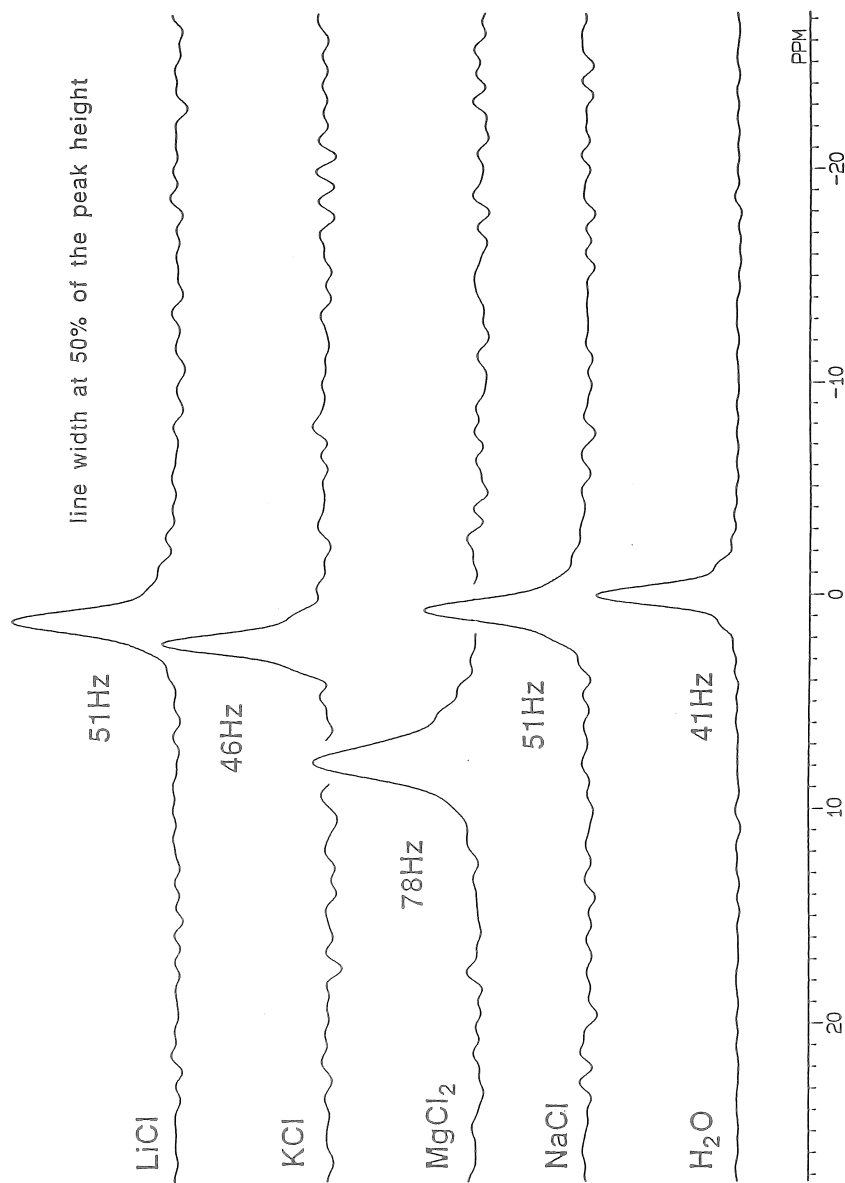


Fig. 8 <sup>17</sup>O NMR spectra of H<sub>2</sub>O in various 4M salt solutions at 40°C (36.58 MHz, <sup>1</sup>H decoupled).

## 5. まとめと今後の展望

以上の研究から、アントシアニン溶液の色がさまざまな無機塩の添加により変化し、同時に安定化されることが明らかにできた。この効果は、2価の塩で顕著であり、食塩のニガリ成分である塩化マグネシウムは、溶液の色を長波長シフトさせ、色を安定化する効果が最も高いことが明らかになった。これらの無機塩類の長波長シフト効果は、アントシアニンB環上のオルトジヒドロキシ基へ金属が配位するためであると推定される。一方、安定化効果は、系内の自由水の減少によるものであることが明らかにできた。

今後、これらの現象をさらに精密に定量的に調べ、アントシアニンの構造と色、および安定化機構に及ぼす無機塩類の効果を明らかにすることができれば、基礎化学的な見地からばかりでなく、食用着色料への応用分野においても極めて有用なものとなろう。

## 参考文献

- 1) Goto, T. and Kondo, T., **1991**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30: 17-33.
- 2) 吉田久美、亀田清、近藤忠雄、ソルトサイエンス研究財団助成研究報告集、平成2年度。
- 3a) Kondo, T., Tamura, H., Yoshida, K. and Goto, T., **1989**. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 797.
- 3b) Yoshida, K., Kondo, T., Kameda, K and Goto, T., **1990**. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 1745.
- 4) Willstätter, R. and Everest, A. E., **1915**. *Ann. Chem.*, 408: 147.
- 5) Shibata, K., Shibata, Y. and Kashiwagi, I., **1919**. *J. Amer. Chem. Soc.*, 41: 208.
- 6) Bayer, E., **1966**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 5: 791.
- 7) Hayashi, K. and Takeda, K., **1970**. *Proc. Jpn. Acad.*, 46: 535.
- 8) 近藤忠雄、吉田久美、中川敦史、河合隆利、田村啓敏、吉兼光雄、後藤俊夫：第33回天然有機化合物討論会（大阪）1991, 10.
- 9) Goto, T., Kondo, T., Tamura, H., Imagawa, H., Iino, A., Takeda, K., **1982**. *Tetrahedron Lett.*, 3695.

## 研究の報告

### 報文

- (1) K. Yoshida, T. Kondo, K. Kameda, S. Kawakishi, A. J. M. Lubag, E. M. T. Mendoza and T. Goto,  
Structure of Alatanin A, B and C Isolated from Edible Purple Yam *Dioscorea alata*.  
(1991) *Tetrahedron Lett.*, **32**, 5575-5578.
- (2) K. Yoshida, T. Kondo and T. Goto,  
Unusually Stable Monoacylated Anthocyanin from Purple Yam *Dioscorea alata*.  
(1991) *Tetrahedron Lett.*, **32**, 5579-5580.
- (3) T. Kondo, K. Yoshida, M. Yoshikane and T. Goto,  
Mechanism for Color Development in Purple Flower of *Commelina communis*.  
(1991) *Agric. Biol. Chem.* **55** 2919-2921.
- (4) 近藤忠雄、吉田久美、  
メタロアントシアニン、  
(1991) 日本農芸化学会誌, **65**, 1371-1375.

### 口頭発表

- (1) 日本農芸化学会1991年度大会(京都)1991、4。  
近藤忠雄、上田実、鈴木可奈子、沖香里、吉田久美、磯部稔、後藤俊夫：  
デルフィニウム青色花弁色素の構造研究。
- (2) 日本農芸化学会1991年度大会(京都)1991、4。  
近藤忠雄、吉田久美、亀田清、川岸舜朗、E.M.T.メンドーサ：  
紫ヤムに含まれるアントシアニンの構造。
- (3) 日本農芸化学会1991年度大会(京都)1991、4。  
吉田久美、高木佐知子、亀田清、近藤忠雄、後藤俊夫：  
塩によるアントシアニンの安定化。
- (4) 第33回天然有機化合物討論会(大阪)1991、10。  
近藤忠雄、吉田久美、中川敦史、河合隆利、田村啓敏、吉兼光雄、  
後藤俊夫：  
ツククサ青色花弁色素コンメリニンの構造。

## Stabilization and Color Variation of Anthocyanins with Inorganic Salts

Kumi Yoshida, Kiyoshi Kameda and Tadao Kondo<sup>+</sup>

Department of Food and Nutrition, School of Life Studies

Sugiyama Jogakuen University

<sup>+</sup>Chemical Instrument Center, Nagoya University

The red, purple and blue colors of flowers, fruits and leaves are mostly anthocyanins. These pigments can be used as safe food colorants, taking the place of synthetic azo-dyes which can contain hepatic toxicity or carcinogenicity. But in neutral media (usual foods indicate pH 4 to 6) anthocyanin first forms purple anhydrobase, but rapidly changes to colorless pseudo base by hydration. Furthermore, it also decolorizes by heating. These properties are major problems in developing its use.

In Japan pigments of leaves of *Perilla ocimoides*, (shiso) are used for coloring salted pickles, such as pickled plum, "umeboshi", and pickled ginger, "benishoga", from long ago. It has been a question why umeboshi keeps such a beautiful red color after several years. Umeboshi is strongly acidic and contains about 20% salt. So salts might be concerned with color stability.

We isolated the pure pigments (malonylshisonin, **1** and shisonin, **2**) from *Perilla* leaves and the obtained pigments were dissolved in various pH's (pH 2 to 8) and concentration's (0 to 4M) salt solutions (NaCl, LiCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>). The stabilities were analyzed by UV-VIS and HPLC.

In acidic aqueous solutions at 80°C, the color of **2** was very stable. In neutral solutions color stability also depended on the concentration of salts. In 4M MgCl<sub>2</sub>, the color was the deepest of all the used salts. So MgCl<sub>2</sub> might strongly prevent the formation of pseudobase. The bathochromic shift of the pigment solutions were observed by addition of MgCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub> and FeCl<sub>3</sub>. This may be caused by chelation of metal ion at *o*-dihydroxy group of B-ring.

The salts must deeply involve in stability of anthocyanidins. These phenomena may be caused by reducing water activity of the solution, which we are suggested by <sup>17</sup>O NMR measurement.