



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	中心子目植物の Betalain 類色素に関する研究 : 主としてあつけしそう (<i>Salicornia europaea</i> L.) の紫赤色色素について
Author(s)	知地, 英征; CHIJI, Hideyuki
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 9(4), 303-372
Issue Date	1976-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11880
Type	departmental bulletin paper
File Information	9(4)_p303-372.pdf



中心子目植物の Betalain 類色素に関する研究

主としてあっけしそう (*Salicornia europaea* L.)
の紫赤色色素について

知 地 英 征

(北海道大学農学部農芸化学科食品栄養学教室)

Studies on Betalain Pigments of Centrospermae Plants
with Special Reference to a Violet Red Pigment
in *Salicornia europaea* L.

Hideyuki CHIJI

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received February 14, 1975

目 次

序 論	304
第1章 北海道に生育する中心子目植物の Betalain 類色素の検索	306
第2章 あっけしそうの紫赤色色素について	311
第1節 あっけしそうについての概説	311
第2節 色素の単離とその物理・化学的性質	311
第3節 色素のアグリコン部の構造決定	317
3-1 色素の部分酸加水分解	317
3-2 アグリコンの単離と構造解析	318
3-3 アグリコンのメチル化物の合成と構造解析	320
3-4 アグリコン部関連化合物の合成	325
第4節 色素の糖部の構造決定	335
4-1 色素の酸加水分解	335
4-2 糖の単離と構造解析	336
4-3 糖部関連化合物の合成	342
第5節 色素のアグリコン部と糖部の結合位置の決定	348
5-1 酵素分解による結合の解析	348
5-2 アグリコン・インドール部の単離と構造解析	348
5-3 アグリコン・インドール部関連化合物の合成	352
第6節 総 合 考 察	354
第7節 色素の食品着色料への応用の適否	354
第3章 まつばわたんの黄色色素について	357
第1節 色素の単離, 物理・化学的性質と同定	357
第2節 関連色素の合成	361
第3節 総 合 考 察	361

要 約	362
引 用 文 献	365
Summary	368

序 論

動植物の生体色素の研究は古くから広く行なわれてきたが、近年とくに、食品添加物の中で着色料として使用されている合成色素の有害性が問題となってきた現在、天然色素——即ち動植物の生体色素——が改めて注目され、より多くの研究がなされつつある。

一方、植物の分類方法として今迄主として形態学的方法が採用されてきたが、最近、植物中に含有するある特定成分の類似性から分類するいわゆる Chemotaxonomy (化学的分類学) の方法もと入れられるようになってきた。この Chemotaxonomical な研究において、視覚的に容易に判別のできる生体色素を利用することは大いに意義があるものとする。

従来、花、果実、葉の赤色、紫色の色調をなす色素は大部分 Anthocyanin 類であると言われてきたが、1800年代、分子中に窒素を含有する赤色色素が赤ビートやアメリカやまごぼう中から発見された。これら一群の特異な赤色色素は Caryophyllinroth, Rübenroth, あるいは Anthocyanin によく似た性質から Nitrogenous anthocyanin とも呼ばれていた。しかし最近では、WEIGERT がはじめに提唱し、SCHUDEL (1918)⁶⁴ が最初に使用し始めた“Betacyanin”の一般名が広く用いられている。この名称は赤ビートの学名 *Beta vulgaris* L. と Anthocyanin 類似の赤い色調とに由来するものである。更に題記の Betalain 類の名称は現在“Betacyanin”類と後述する“Betaxanthin”類との総称名として使用されている。

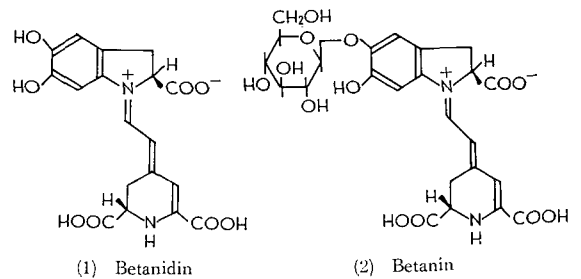
これらの色素の最初の研究が始められたのは19世紀の終わり頃で、当時、ブドウ酒の添加物としてアメリカやまごぼうや赤ビートの色素が使用されていたため、その添加混入を識別する方法として始められた。

BISCHOFF (1876)³ や HILGER ら (1879)¹⁸ はこの色素と Anthocyanin とを区別するカラーテストを提唱し、その後 WEIGERT ら (1894)⁶⁸ などによってこの種の判別呈色反応がいくつか報告された。その結果、ブドウ酒の色素と添加物に使用されていた植物色素とは明瞭に異なることが確かめられた。その後、BISCHOFF (1876)³, HILGER (1879)¹⁸, WEIGERT (1894)⁶⁸ に続き GERTZ (1906)¹³, KRYZ (1926)²⁵, ROBINSON 一派 (1931~41)²⁷,

TAYLER (1939)⁶⁶, RAUH と REZNIK (1961)⁶⁷, MABRY ら³⁰ の研究によって Betacyanin 類の植物界における存在の特異性が明らかにされた。現在までのところ、この Betacyanin は中心子目 (Centrospermae) に属する植物以外には存在せず、また Betacyanin と Anthocyanin は決して共存することがないと言われている。このように一連の研究によって一種の指標物質とも言える Betacyanin が、植物分類学において Chemotaxonomy の観点から見て、重要な物質であることが理解される。

Betacyanin 類の単離、結晶化の試みは1876年 BISCHOFF³ に始まり、HAVERLAND (1892)¹⁵, SCHUDEL (1918)⁶⁴, AINLEY ら (1937)¹¹, PRICE ら (1937)⁵⁵, PUCHER ら (1937)⁵⁶ によって行なわれたが、いずれも成功せず、1957年 SCHMIDT ら⁶³ と WYLER ら^{71,73} が、初めて、時を同じくして、Betacyanin 類の一種である Betanin を赤ビートから結晶化することに成功した。このように色素を結晶状に単離するまでに約80年の歳月が費やされた第一の理由として、この色素が非常に不安定なことが挙げられる。また水溶性色素のため、精製に当たって他の夾雑物を除去することが困難であったことによるものと推定される。

単離、結晶化された Betanin の構造研究は、1962年から1963年にかけて DREIDING, MABRY および WYLER 一派^{69,72,74,75} によって、そのアグリコンである Betanidin の構造が下図(1)のように決定された。また糖部を含めた Betanin の全構造は1965年同じく、彼ら⁶⁹ によって(2)のように確定された。



また PIATTELLI, MINALE ら一派は多くの中心子目植物から Betacyanin 類を単離し、多数の報告をしている。これら両派によって構造解明が試みられ現在までに

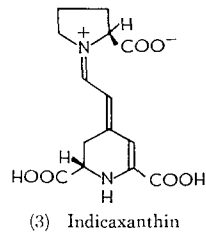
Table 1. Betacyanins, Whose Chemical Structures Have Been Confirmed or Estimated

Confirmed	Estimated
Betanin ^{44,52,63,69,71,73)}	Bougainvillein-r-II ⁴⁰⁾
Isobetanin ^{52,69)}	Isobougainvillein-r-II ⁴⁰⁾
Betanidin (Aglycone of betanin)	Bougainvillein-r-III ⁴⁰⁾
Isobetanidin (Aglycone of isobetanin)	Bougainvillein-r-IV ⁴⁰⁾
Prebetanin ⁷⁶⁾	Bougainvillein-r-V ⁴⁰⁾
Amarantin ⁵³⁾	Gomphrenin-VII ³⁴⁾
Isoamarantin ⁵³⁾	Gomphrenin-VIII ³⁴⁾
Bougainvillein-r-I ⁴⁰⁾	Lampranthin-I ³⁷⁾
Isobougainvillein-r-I ⁴⁰⁾	Isolampranthin-I ³⁷⁾
Celosianin ³⁵⁾	Lampranthin-II ^{37,38)}
Isocelosianin ³⁵⁾	Isolampranthin-II ^{37,38)}
2-Descarboxybetanidin ³⁸⁾	Pigment-Ia ²¹⁾
DP-1 Pigment ⁴¹⁾	Pigment-Ib ²¹⁾
DP-2 Pigment ⁴¹⁾	Pigment-IIa ²¹⁾
DP-3 Pigment ⁴¹⁾	Pigment-IIb ²¹⁾
DP-4 Pigment ⁴¹⁾	Suaedin ⁴²⁾
Gomphrenin-I ³⁴⁾	
Gomphrenin-II ³⁴⁾	
Gomphrenin-III ³⁴⁾	
Gomphrenin-V ³⁴⁾	
Gomphrenin-VI ³⁴⁾	
Iresinin-I ³⁵⁾	
Isoiresinin-I ³⁵⁾	
Phyllocactin ³⁵⁾	
Isophyllocactin ³⁵⁾	

構造の確定, 又は推定された Betacyanin 類は次に表示したものがあ (Table 1)。

一方, 中心子目植物には, 前述の赤色素 Betacyanin 類の他に橙黄色を呈する Betaxanthin 類と呼ばれている一群の色素が存在する。ここで非常に興味あるのは Betacyanin の場合には Anthocyanin の共存を許さないとされているのに対し Betaxanthin の場合には, 黄~褐色色素 Flavonol の共存を許すことである。

Betaxanthin 類の一つとしてまず Indicaxanthin (3) が結晶化され, その構造が決定されたが⁵¹⁾, その後は, Betacyanin と違って色素の精製, 単離が非常に困難なため, その研究は少なく, 現在ま



で構造の確定, また推定された Betaxanthin 類はその数が甚だ少数である (Table 2)。

このように Betalain 類色素の中にはまだ構造の明らかにされていないもの, あるいは推定構造の範囲に止まっているものも多く, また中心子目植物中にはまだ生体成分の研究が行なわれていない植物もあることに注目し, 著者は Chemotaxonomical な興味と食品化学的な関心からこの Betalain 類の研究を始めた。

本論文に記述する研究では, まず中心子目に属している, 北海道で野生し, あるいは, 園芸用として栽培されている植物 10 種 22 品種について, ペーパークロマトグラフィー, 濾紙電気泳動などにより Betalain 類, とくに Betacyanin 類を中心に検索を行なった。次にこの目に属しているが, 日本ではわずかに北海道東部塩湿地にのみ生育しており, ほとんど有機化学成分の研究が行な

Table 2. Betaxanthins, Whose Chemical Structures Have Been Identified, Estimated, or Unidentified

Identified	Estimated, or Unidentified
Dopaxanthin ²⁰⁾	A-3 Pigment ⁴⁷⁾
Indicaxanthin ^{47,51)}	Ei 0.67-Pigment ⁵⁴⁾
Miraxanthin-I ⁴⁷⁾	Ei 0.91-Pigment ⁵⁴⁾
Miraxanthin-II ⁴⁷⁾	Ei 0.94-Pigment ⁵⁴⁾
Miraxanthin-III ⁴⁷⁾	Ei 1.20-Pigment ⁵⁴⁾
Miraxanthin-V ⁴⁷⁾	Miraxanthin-IV ⁴⁷⁾
Vulgaxanthin-I ^{50,54)}	Miraxanthin-VI ⁴⁷⁾
Vulgaxanthin-II ^{50,54)}	Portulaxanthin ⁴⁸⁾

われていないあつけしそう (*Salicornia europaea* L.) の紫赤色素の研究を行なった。この小さな植物の多肉多汁質の莖葉部は採取地からの輸送中腐敗を起し易い上、色素の含量は少なく、しかも含有する微量の色素を精製することは多量の含有塩分も獨りして困難にみまわれたが、数年に亘り単離した粗色素から紫赤色素を純粋に結晶化することが出来、その化学構造を明らかにすることが出来た。さらに、この色素の食品着色料としての応用の可能性について若干の実験を行なった。最後に、まだ研究の行なわれていなかったまつぼたん (*Portulaca grandiflora* HOOK.) の黄色花から橙黄色色素を非晶物の形で単離し、Betanin とアミノ酸との転換合成によって得た Betaxanthin と比較実験することによりその構造を推定したことについても記述する。

第1章 北海道に生育する中心子目植物の Betalain 類色素の検索

現在までに Betacyanin を含有し Chemotaxonomical に中心子目 (Centrospermae) に属するもの、あるいは属すべきものとして次の10科の植物が挙げられている^{11,29,30)}。

- (1) Chenopodiaceae (あかざ科)
- (2) Amaranthaceae (ひゆ科)
- (3) Nyctaginaceae (おしろいばな科)
- (4) Phytolaccaceae (やまごぼろ科)
(Petiveriaceae)
- (5) Aizoaceae (つるな科)
(Ficoidaceae, Mesembryanthemaceae)
- (6) Portulacaceae (すべりひゆ科)
- (7) Basellaceae (つるむらさき科)
- (8) Cactaceae (さぼてん科)
- (9) Stegnospermaceae

(10) Didieraceae

また Betacyanin 色素の種類としては、今迄に化学構造が解明されたものの他、単に名称のみが与えられたものをも含めて46種類があり^{11,34,35,39,45)}、なおその数は増加しつつある。

一方、Betaxanthin 類についての分布研究としては、1955年から1957年にかけての REZNIK^{58,59,60)} の定性的な研究があり、その後、1963年から1973年にかけて PIATTELLI ら^{20,43,47,48,49,51,54)} によって、16種の Betaxanthin が単離され、この中8種は構造が決定された。

ここでは、北海道で栽培、あるいは野生している中心子目植物10種(22品種)、即ちあかざ科3種、ひゆ科4種、おしろいばな科1種、すべりひゆ科2種について、粗色素を抽出し、吸収スペクトル、ペーパークロマトグラフィー、濾紙電気泳動などによって Betacyanin を主として Betaxanthin を副として、Betalain 類の定性的検索を行なった。

<実験>

供試植物:

供試植物の詳細は次表の通りである (Table 3)。

色素の抽出法:

各植物 (100~200 g) を冷 0.1% HCl (pH 3) (500 mℓ) でホモジネートし、搾汁を 4°C, 9,000 回転で10分間遠心分離し、上澄液を Dowex 50 W-X 2 (H⁺) カラム (φ 2×15 cm) に吸着、0.1% HCl (1 ℓ) で洗浄後、水で溶出し、30°C で減圧濃縮し、ペーパークロマトグラフィー、濾紙電気泳動などの試料液とした。

ペーパークロマトグラフィー (以下 PC と略記):

濾紙: 東洋濾紙 No. 51

溶媒: (A) 0.1 M Formic acid (pH 2.4)

(B) 0.05 M Pyridine-formic acid (pH 4.5)

移動度; Betanin の移動度に対する比移動度 R_B で

Table 3. Tested Centrospermae-plants

Plant	Growing condition	Harvesting Place
1) Chenopodiaceae (あかび科)		
<i>Chenopodium album</i> L. (あかび)	1 sp. Wild	Experiment Farms of Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido
<i>Beta vulgaris</i> var. <i>rubra</i> L. (赤ビート)	4 c.v. Cultivated	Experiment Farms of Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido
<i>Salicornia europaea</i> L. (あっけしそう)	1 sp. Wild	Lake-side of Notoro, Abashiri, Hokkaido
2) Amaranthaceae (ひゆ科)		
<i>Amaranthus tricolor</i> L. (けいと)	3 c.v. Cultivated	"Sapporo-Saishu-En", Sapporo, Hokkaido
<i>Celosia cristata</i> L. (とさかけいと)	3 c.v. Cultivated	"Sapporo-Saishu-En", Sapporo, Hokkaido
<i>Celosia plumosa</i> L. (羽毛けいと)	3 c.v. Cultivated	"Sapporo-Saishu-En", Sapporo, Hokkaido
<i>Gomphrena globosa</i> L. (せんにちこう)	1 c.v. Cultivated	"Sapporo-Saishu-En", Sapporo, Hokkaido
3) Nyctaginaceae (おしろいばな科)		
<i>Mirabilis Jalapa</i> L. (おしろいばな)	1 sp. Cultivated	"Sapporo-Saishu-En", Sapporo, Hokkaido
4) Portulacaceae (すべりひゆ科)		
<i>Portulaca oleracea</i> L. (すべりひゆ)	1 sp. Wild	Experiment Farms of Hakkaido University, Sapporo, Hokkaido
<i>Portulaca grandiflora</i> HOOK. (まつばたん)	4 c.v. Cultivated	"Sapporo-Saishu-En", Sapporo, Hokkaido

示した。

濾紙電気泳動 (以下 PE と略記):

装置: 小林式濾紙電気泳動 SA 型

濾紙: Whitmann No. 1 濾紙, 東洋濾紙 No. 51

泳動条件: 400 V, 電位勾配 16 V/cm, 1 時間

緩衝液:

(A), (B); PC の溶媒と同じ

(C); Veronal buffer (pH 8.6)

電解液: 1% KCl

泳動度: Betain の泳動度に対する比泳動度 EB で

あらわした。

可視, および紫外線吸収スペクトル (以下 UV と略記):

装置: 日立 124 型自記分光光度計

溶媒: 水, 前述の試料液, および必要の時は PC,

PE 処理後のスポット溶出液についても測定した。

Betacyanin-Anthocyanin 間および Betaxanthin-Flavonol 間の判別反応:

多数枚の PC あるいは PE 展開によって得た色素スポットあるいはゾーンを切り少量の水で溶出し, その溶出液について, 小白色紙製皿上でそれぞれ次の各種の色素判別反応を行ない, その観察結果に基づき Betacyanin と Anthocyanin 間の判別, および Betaxanthin と Flavonol 間の判別を行なった。

Betacyanin-Anthocyanin 間	Betaxanthin-Flavonol 間
メタノールに対する溶解性 ⁶⁰⁾	メタノールに対する溶解性 ⁶⁰⁾
水・アミルアルコール間分配性 ^{17,60,68)}	溶液の安定性 ⁶⁰⁾
NaOH 添加とその後の再酸性化 ^{3,15,60,68)}	AlCl ₃ による深色化 ⁶⁰⁾
NH ₄ OH 添加 ^{60,68)}	
HCl 添加 ^{60,68)}	
HNO ₃ 添加 ^{60,68)}	
酢酸鉛添加 ^{3,60,68)}	

<実験結果と考察>

赤~紫赤色の溶出液については主として Betacyanin-Anthocyanin 間判別反応を行なったところ全てについてほぼ同一の結果を得たので, 各々については記述を略し一括して述べる。

赤~紫赤色色素はメタノールよりも水に易溶, 低 pH 水溶液からアミルアルコールに移行しない, NaOH 添

加により比較的速かに黄変し再酸性化により赤色が緩徐に再生あるいは再生しない, NH₄OH 添加により黄変する, HCl 添加により冷時では紫色が強くなり, 熱時には

退色する, HNO₃ 添加により直ちに退色する, また酢酸鉛添加により赤褐色沈殿を生じた。

Table 4. Paper-chromatographic and Paper-electrophoretic Properties of Pigments of Centrospermae-Plants^{11,34,35,45)}

1) Betacyanins

Plant	Part	λ_{\max} (m μ) ¹⁾		A		B		C ²⁾
				RB	RB	EB	EB	
* <i>Chenopodium album</i> L.	Leaf	542-545	(R)	1.29	0.79	0.97	1.18 1.00	1.06
* <i>Beta vulgaris</i> var. <i>rubra</i> L.								
c.v. Detroit Dark Red	Root	538	(VR)	1.00	1.00 0.78	1.00	1.00 0.93	1.00
c.v. Half Sugar Red	Root	485	(R)				1.01	1.00
* <i>Salicornia europaea</i> L.	Leaf	538	(R)	1.21	0.83	0.95	1.22	1.10
* <i>Amaranthus tricolor</i> L.								
c.v. Sunrise	Leaf	540	(VR)		1.12		1.16	1.10
c.v. Illumination	Leaf	538	(VR)	1.25	0.94	1.02		
c.v. Early Splendour	Leaf	538	(VR)	1.83	1.14 1.09	1.13	1.32	
* <i>Celosia cristata</i> L.								
c.v. Toreador	Flower	538	(VR)	1.61 1.05	1.15 0.74	1.16 0.47	1.21 0.70	
c.v. Scarlet Giant	Flower	538	(VR)	1.49 0.98	1.14 1.10 0.79	1.08 0.49	1.25 0.71	
c.v. Rose Beauty	Flower	538	(VR)	0.96	1.05 0.71	1.03 0.36	1.14 0.67	
* <i>Celosia plumosa</i> L.								
c.v. Fairly Feather	Flower	538	(VR)	1.37 1.19 0.67	1.11 1.05 0.77	1.02	1.19 1.08 1.03	1.06
* <i>Gomphrena globosa</i> L.								
c.v. Grobe Amaranth	Flower	545	(V)	1.07	0.96 0.86	0.83 0.70	1.20 1.12 1.00 0.87	1.09 1.00 0.93
* <i>Mirabilis Jalapa</i> L.	Flower	529-532	(R)	1.02	1.07 1.03	0.94	1.01 0.92	
* <i>Portulaca oleracea</i> L.	Stem	538-542	(R)	0.79	0.83	0.75	0.86	
* <i>Portulaca grandiflora</i> HOOK.								
c.v. Pink	Flower	538	(R)	1.04 0.39	0.94 0.87 0.41	0.95 0.20	0.98 0.58	1.00
c.v. Red	Flower	540	(R)	1.08 0.45	0.99 0.91	0.92 0.32	1.03 0.94 0.45	1.00
c.v. Orange	Flower	538	(OY)	0.94	0.84 0.68	0.89	1.24	
c.v. Yellow	Flower	470-475	(Y)	1.03	0.90 0.79	1.13 0.97	0.97	

(to be continued)

2) Betaxanthins

Plant	Part	λ_{max} ($m\mu$) ¹⁾	A		B		C ²⁾
			RB	RB	EB	EB	EB
<i>*Beta vulgaris</i> var. <i>rubra</i> L.							
c.v. Detroit Dark Red	Root	538	(VR)			1.08	1.42
c.v. Half Sugar Red	Root	485	(R)				1.19
c.v. Barres Stryne	Root	472	(OY)				1.20
c.v. Half Sugar Yellow	Root	470	(OY)				1.23
<i>*Salicornia europaea</i> L.	Leaf	538	(R)	1.27	1.04		
<i>*Amaranthus tricolor</i> L.							
c.v. Illumination	Leaf	538	(VR)			0.79	
<i>*Celosia cristata</i> L.							
c.v. Toreador	Flower	538	(VR)		1.00		0.86
c.v. Scarlet Giant	Flower	538	(VR)		0.96		0.70
<i>*Celosia plumosa</i> L.							
c.v. Golden Feather	Flower	480	(OY)	1.96	0.78		0.67 1.29 0.84
c.v. Fairly Feather	Flower	538	(VR)	1.07	0.93		1.03
<i>*Mirabilis Jalapa</i> L.	Flower	529-532	(R)	0.99	0.80		0.75 0.54
<i>*Portulaca oleracea</i> L.	Stem	538-542	(R)	0.61 0.40	0.59 0.49	0.39	0.70 0.70
<i>*Portulaca grandiflora</i> HOOK.							
c.v. Pink	Flower	538	(R)		0.56	0.32	0.69
c.v. Red	Flower	475	(R)	1.45 0.78	0.57		0.58
c.v. Orange	Flower	475	(OY)	1.22	0.95 0.40	1.50 0.39	1.37 0.46
c.v. Yellow	Flower	470-475	(Y)	1.44	1.04 0.56	1.27 0.88	1.38

Remarks: 1) Absorption values (λ_{max}) are those of the pigment extracts of plants described in "Experimental", and colors of the extracts are given in bracket.

R, red; VR, violet red; O, orange; Y, yellow; and OY, orange yellow.

2) Details of solvents (A, B, and C), RB, and EB are described in "Experimental".

以上の現象は Anthocyanin の場合に観察されるものとは全く異なっており、Betacyanin に特有の反応であった。従って供試植物中に含まれる赤～紫赤色素は全て Betacyanin 類に属し、Anthocyanin 類に属するものでないことがわかった。

黄～橙黄色 溶出液については Betaxanthin-Flavonol 間判別反応を行なった。その結果は赤色系色素の場合程明確ではなかったが、全ての供試液においてメタノールよりも水に易溶、室温で比較的不安定であり、 $AlCl_3$ によって濃黄橙～橙色に深色化した。これらのことは Flavonol の場合とは異なる現象であった。

かくて黄～橙黄色を呈する供試植物の色素は Betaxanthin 類であろうと推定できた。しかし判別し兼ねる反応を呈する場合もあったので、Flavonol の共存を否定するものではない。

以上により供試した植物の色素は少なくとも大部分が Betalain 類であろうと推定した。

次に各色素粗抽出液の UV (λ_{max}) 値、PC の RB 値、および PE の EB 値として得た結果 (Table 4) を他の研究者^{11,34,35,45)} の既報値と比較して色素の暫定的な同定を行なった。ここでは検討の詳細を略し同定して得た関係色素についてのみ述べることにする。

即ち Betacyanin 類については抜粋した既報値 (Table 5), Chemotaxonomical な研究のデータ^{11,29)}, および個々の研究を参考にし, 比較対照した結果, 供試植物の Betacyanin のうちいくつかを定性的に同定し得た (Table 6)。しかしソ化合物との判別はできなかった。なお Betaxanthin 類については個々の研究^{47,51,54,60)}

を参考にして同定を試みたが, *Beta vulgaris* L. の4品種から検出された色素が Vulgaxanthin の一種であると推定された以外は同定することができなかった。

一般に同属中では異なる種の間でも色素構成が非常によく似ていた。しかし例外もあることが報告されており, 将来さらに検討が必要であろう。

Table 5. Reported Properties of Betacyanins^{11,34,35,45)}

Betacyanin	λ_{\max} (H ₂ O) (m μ)	Paper-chromatogram		Paper-electrophoretogram	
		RB	RB	EB	EB
		pH 4.5	pH 2.4	pH 4.5	pH 2.4
Betanin	535-538	1.00	1.00	1.00	1.00
Isobetanin	538	—	—	0.93	0.93
Amarantin	536-540	1.14	1.10-1.16	1.16-1.25	1.00-1.10
Isoamarantin	536	—	—	1.16	1.00
Celosianin	544-546	—	—	1.26	1.11
Isocelosianin	542-544	—	—	1.26	1.11
Gomphrenins	535-545	—	0.70	0.78-1.00	0.63-0.96
Mesembryanthemin-II and -III	540-542	—	—	0.48	0.28
Oleracin-I and -II	534-536	—	—	0.80	0.72

Remarks: RB, Relative Rf-value (Betanin=1.00)

EB, Relative electrophoretic mobility (Betanin=1.00)

Table 6. Betalains Estimated by Qualitative Analyses

Plant	Betalain	
	Betacyanin	Betaxanthin
1) Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium album</i> L.	Amarantin, isoamarantin	—
<i>Beta vulgaris</i> var. <i>rubra</i> L.		
c.v. Detroit Dark Red	Betanin, isobetanin	Vulgaxanthin (-II?)
c.v. Half Sugar Red	Betanin, isobetanin	Vulgaxanthin
c.v. Barres Stryne	—	Vulgaxanthin
c.v. Half Sugar Yellow	—	Vulgaxanthin
<i>Salicornia europaea</i> L.	Amarantin, isoamarantin	Not estimated
2) Amaranthaceae		
<i>Amaranthus tricolor</i> L.		
c.v. Sunrise	Amarantin, isoamarantin	—
c.v. Illumination	Amarantin, isoamarantin	Not estimated
c.v. Early Splendour	Amarantin, isoamarantin	—
<i>Celosia cristata</i> L.		
c.v. Toreador	Celosianin, isocelosianin, Amarantin, isoamarantin*)	Not estimated
c.v. Sarlet Giant	Celosianin, isocelosianin, Amarantin, isoamarantin*)	Not estimated
c.v. Rose Beauty	Celosianin, isocelosianin, Amarantin, isoamarantin*)	Not estimated

Plant	Betalain	
	Betacyanin	Betaxanthin
<i>Celosia plumosa</i> L.		
c.v. Golden Feather	—	Not estimated
c.v. Fairy Feather	Amarantin, isoamarantin Celosianin, isocelosianin	Not estimated
<i>Gomphrena globosa</i> L.		
c.v. Globe Amaranth	Amarantin, isoamarantin Gomphrenins	—
3) Nyctaginaceae		
<i>Mirabilis Jalapa</i> L.	Betanin, isobetanin	—
4) Portulacaceae		
<i>Portulaca oleracea</i>	Oleracin-I Oleracin-II	Not estimated
<i>Portulaca grandiflora</i> HOOK.		
c.v. Pink	Betanin, isobetanin Mesembryanthemin-II, -III	—
c.v. Red	Betanin, isobetanin Mesembryanthemin-II, -III	—
c.v. Orange	Betanin, isobetanin Mesembryanthemin-II, -III	(Indicaxanthin ?)
c.v. Yellow	Betanin, isobetanin	(Indicaxanthin ?)

*) Furthermore, betacyanins having lower RB- and EB-values have been detected (Bougainvilleins ?).

第2章 あっけしそうの紫赤色色素について

第1節 あっけしそうについての概説

あっけしそう (*Salicornia europaea* L.) は中心子目 (Centrospermae) 植物に属し、塩湿地に自生し、秋期 (9月~10月) に多肉質の葉茎部全体が赤紫色を呈する高さが15~20 cm位の一年生塩生植物である (Photo. 1参照)。

和名“あっけしそう”は最初の発見地である北海道釧路国支庁厚岸に由来したもので異名“さんごそう”、“やちさんご”はその色と形状から、また“はままつ”は海岸にはえ、形状が松に似ていることに由来した (Photo. 2参照)。

学名は牧野の新日本植物図鑑³³⁾に *Salicornia herbacea* L. と記載されているが、伊藤¹⁹⁾の詳細な研究によると、*Salicornia europaea* L. の方が妥当とされているので、本論文では後者を採用した。

Salicornia 属植物の分布は広く、世界ではヨーロッパ全域、南北両アフリカ、温帯アジア、温帯アメリカの海岸沿い、時には内陸の塩湿地に生育していると言われていたが、日本では分布がせまく、本州では東北地方 (宮城県宮城郡岩井崎旧塩田) に、四国地方では香川県、愛

媛県の塩田にわずかに生育していたが、絶滅に瀕しつつあり、群落としては、唯、北海道東部オホーツク海沿岸 (能取湖、佐呂間湖等)、太平洋沿岸 (厚岸湖等) にも生育し、その群落も年々減少し、いずれ他の地方と同様、絶滅するのではないかとされている。

従来の *Salicornia* 属の研究はほとんど形態学的な研究や生育と土壤塩分との関係に関する研究が主で、この植物中に含有する有機化学成分についての研究はほとんどない。次にこの少ない既報の研究を一括して表に掲げる (Table 7)。

そこで、*Salicornia* 属植物の有機化学成分について広く解明を行なうことは非常に興味があることと思われるが、ここでは先の Survey Study でテストした中心子目植物中、わが国では稀有の *Salicornia* 植物であり、植生上からもまた含有色素の点からも特異の存在であるとともに、化学研究の行なわれていないあっけしそうを取り上げ、その紫赤色色素の単離、結晶化と化学構造の究明を行なうこととした。

第2節 色素の単離とその物理・化学的性質

能取湖周辺の塩湿地で採集したあっけしそうの稀塩酸抽出液からイオン交換樹脂、ポリアミドカラム等で色素を抽出・分離、精製し、その中紫赤色の色素はこれを初

Table 7. Reported Organic Constituents of *Salicornia* Plants

Plant	Chemical constituent	Remarks	Literature
<i>S. bigelovii</i>	Hydrocarbons C ₂₁ -C ₃₃		WEETE et al. (1970) ⁶⁷⁾
	Satd. fatty acids		
	Myristic acid, the other six acids		WEETE et al. (1970) ⁶⁷⁾
	Unsatd. fatty acids		
	Myristoleic acid, the other five acids		WEETE et al. (1970) ⁶⁷⁾
<i>S. disarticulata</i>	Ascorbic acid	Quant. anal.	HAGÈNE (1958) ¹⁴⁾
<i>S. fruticosa</i>	Basic substances		
	Betaine	2.66%, dry basis	SUSPLUGAS et al. (1969) ⁶⁵⁾
	Four alkaloids		SUSPLUGAS et al. (1969) ⁶⁵⁾
<i>S. herbacea</i>	Basic substances		
	Saliherbine (tert. base) C ₉ H ₂₁ N ₅ O ₄	Structure undetermined	BORKOWSKI et al. (1965) ⁸⁾
	Salicornine (tert. base) C ₅ H ₁₁ NO ₂	Structure undetermined	BORKOWSKI et al. (1965) ⁸⁾
	Compd-C (quart. base)	Structure undetermined	BORKOWSKI et al. (1965) ⁸⁾
	Compd-D (quart. base)	Structure undetermined	BORKOWSKI et al. (1965) ⁸⁾
	Choline	as Au-salt	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
	Betaine	aa Au-salt	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
	Acidic substances		
	Oxalic acid	Identified	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
	Fatty acid	Unidentified	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
	Others		
	Phlobaphenes	Unidentified	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
	Resin constituents	Unidentified	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
	Wax alcohol (M.p. 64°C)	Unidentified	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
	Sterol	Unidentified	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
	Levo. invert sugar	Phenylosazone, m.p. 203°C	ZELLNER et al. (1930) ⁷⁹⁾
<i>S. perennis</i>	Ascorbic acid	Quant. anal.	HAGÈNE (1958) ¹⁴⁾
	Betacyanins	Qual. anal.	MABRY et al. (1963) ⁹⁰⁾

めて結晶化することに成功し、その物理・化学的性質を調べ、それが Betacyanin 類色素の一つであることを確かめた。

<実験>

供試植物:

供試したあつけしそうは北海道網走市能取湖西岸卯原内周辺の塩湿地で昭和41年から48年に亘る8年間に毎年9月下旬の赤色の最も美しい最盛期に、はさみで根際から茎葉部のみを採取し、研究室まで輸送し、直ちに充分水洗し、土砂その他の附着物を取去って後、-20°Cに凍結貯蔵した。これを必要に応じ随時実験に供した。なお昭和41, 46, および47年に採取した植物は輸送途中に若

干変質し使用することはできなかったが、この実験に供試したものは全て新鮮状態を保っていたものであった。

色素の抽出・単離:

色素の抽出・単離の方法は実験結果と考察の項で後記する。

機器分析法:

融点; 電熱式顕微鏡装置で測定。

元素分析; 北海道大学薬学部中央元素分析室に依頼、測定。

可視および紫外線吸収スペクトル(以下UVと略記);

日立124型自記分光光度計で測定。

赤外線吸収スペクトル(以下IRと略記); EPI S 2



Photo.1 Vegetation of *Salicornia europaea* L. at Lake-side Salt Marsh of Notoro, Abashiri, Hokkaido.

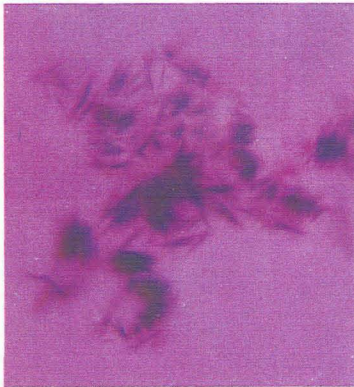


Photo.3 Crystals of "Salicornia Pigment"
(Microscopic photograph)

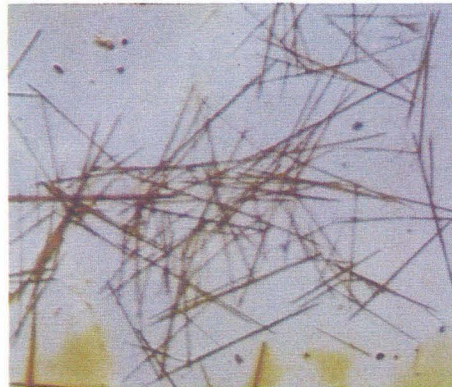


Photo.4 Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment
(Microscopic photograph)



Photo.2 *Salicornia europaea* L.

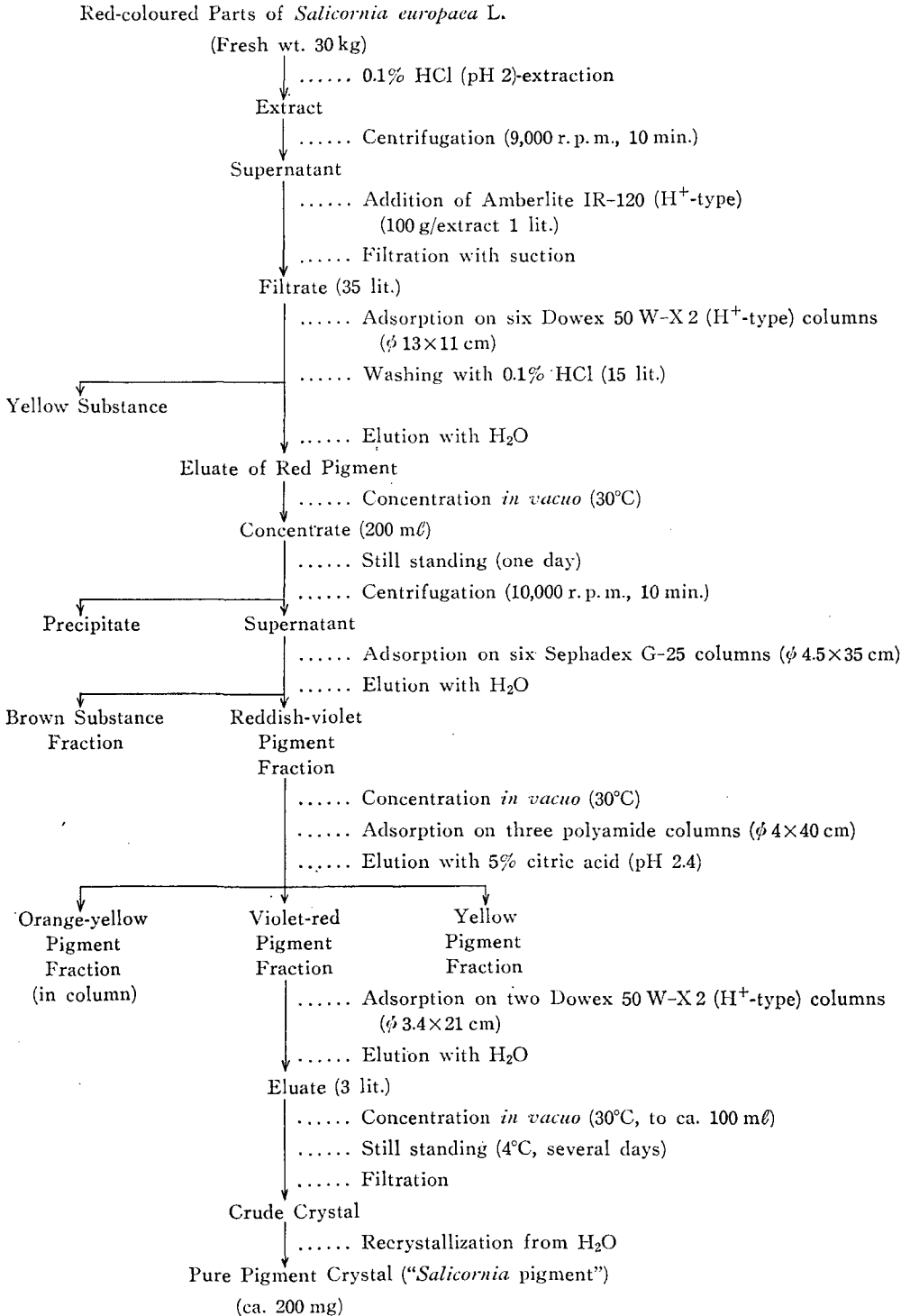


Fig. 1. Isolation and Crystallization of Violet-red Pigment from *Salicornia europaea* L.

型日立赤外線分光光度計を使用, KBr 錠剤, または Nujol 法で測定。

核磁気共鳴スペクトル (以下 NMR と略記); 100 MHz 測定は北海道大学理学部 NMR 分析室に, 90 MHz は同大学農学部農芸化学科農産物利用学教室に依頼し測定した。溶媒- CF_3COOH , あるいは CDCl_3 , 内部標準-TMS。

呈色反応および ERDMANN 反応:

塩酸, アンモニア, あるいは 1N 水酸化ナトリウムによる呈色反応は色素の微量を水に適宜の濃度に溶解し, それぞれの試薬を添加して呈色を検した。

再酸性化テストは色素溶液を一旦水酸化ナトリウムでアルカリ性とし呈色を検した後, 塩酸溶液を添加し酸性とし, その際の色素の色の再生を観察した。

酢酸鉛テストは色素溶液に塩基性酢酸鉛飽和溶液を添加し, 沈殿生成の有無および沈殿の色を観察した。

ERDMANN の分配テストは色素の水溶液を小試験管にとり同量のアミルアルコールを添加し, 振盪抽出し色素のアミルアルコール層への移行の有無を検した。

<実験結果と考察>

色素の抽出・単離:

色素の抽出・単離の方法および結果の典型的な例は次のようである (Fig. 1)。

この植物 (新鮮物 30 kg) に 0.1% HCl 水溶液 (pH 2) を加え, ホモジネート後布で搾り, 一夜低温に静置後, 4°C , 9,000 回転で 10 分間遠心分離を行なった。この上澄液に Amberlite IR-120 (H^+ 型) を添加, 攪拌し, Na^+ , K^+ , 等のカチオンを吸着させ, 吸引濾過, 濾液 (35 ℓ) を 4°C の低温で 6 本の Dowex 50 W-X 2 (H^+ 型, $\phi 13 \times 11$ cm) のカラムに通し, 各々 0.1% HCl (15 ℓ) で洗浄後, 脱塩水で紫赤色色素を溶出した。この溶出液を 30°C で減圧濃縮し, 濃縮液 (200 m ℓ) を 1 日間放置し沈降する褐色沈殿を遠心分離 (10,000 r.p.m. 10 分間) して除去し, 上澄液を 6 本の Sephadex G-25 のカラム ($\phi 4.5 \times 35$ cm) に通し, 水で展開溶出し, 赤紫色色素バンドの溶出液を集め, 30°C で減圧濃縮した。濃縮液 (100 m ℓ) を 3 本のポリアミドカラム ($\phi 4 \times 40$ cm) に吸着させ, 5% クエン酸水溶液 (pH 2.4) で展開溶出させたところ, 黄色色素の後に, 紫赤色の主色素が溶出して来たので, これを集めクエン酸を除去するため, さらに 2 本の Dowex 50 W-X 2 カラム (H^+ 型, $\phi 3.4 \times 21$ cm) に吸着, 0.1% HCl (4 ℓ) で洗浄後, 水で色素を溶出, 溶出液 (3 ℓ) を少量 (約 100 m ℓ) 濃縮し, 4°C に数日間静置し, 生成した粗色素を濾過し, これを水から再結したところ, 微細な紫赤色の針状結晶 [200 mg, 収率 0.00067%, M.p. 190°C (分解)] (Photo. 3 参照) が得られた。以後この色素

Table 8. Properties of *Salicornia* Pigment

Pigment crystal	Violet red, fine needle crystals
M.p. ($^\circ\text{C}$)	190 (decomp.)
Solubility	Easily soluble in water, acetic acid, trifluoroacetic acid Sparingly soluble in methanol, and ethanol Insoluble in ether, carbon tetrachloride, chloroform, and dichloromethane

Table 9. Colour- and ERDMANN's Distribution-tests of *Salicornia* Pigment

Test	Result	
	<i>Salicornia</i> pigment	Anthocyanin ^{11,60}
HCl	Deep violet	Red
Ammonia	Violet colour retained for 2-3 hrs in the cold	Blue
1N-NaOH	Rapidly decolourized to yellow	Blue—yellow
Reacidification	Not regenerated red colour even after re-acidification of yellowish alkaline solution	Reversible
Lead acetate	Reddish brown ppt.	Bluish green or bluish grey ppt.
ERDMANN's distribution test (Distribution between water and amylalcohol)	Not transferred into amylalcoholic phase from aqueous one at higher or lower pH's	Transferred

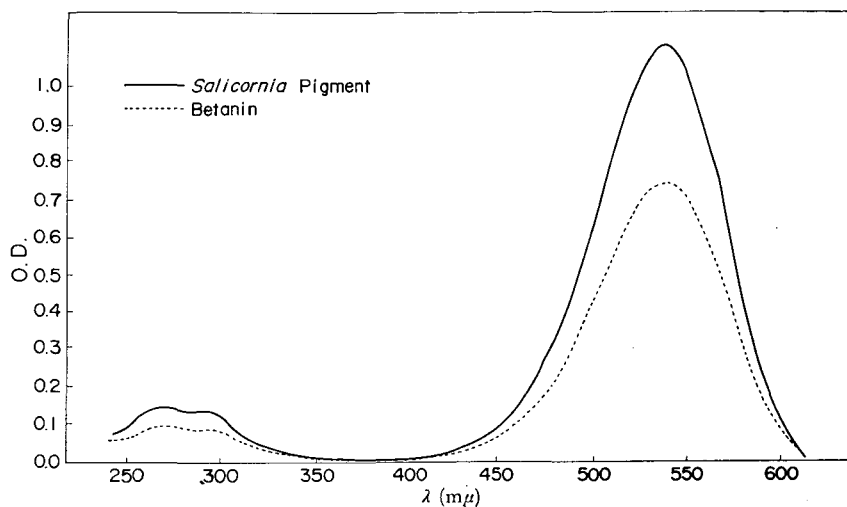


Fig. 2. Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of *Salicornia* Pigment and Betanin in Water.

Table 10. Comparison of Values of Elementary Analysis between *Salicornia* Pigment and Known Betacyanins

Pigment	Molecular Formula	C%	H%	N%	Cl%
<i>Salicornia</i> Pigment	—	47.82	4.96	3.24	4.60
Amarantin Isoamaratin	$C_{30}H_{34}O_{19}N_2HCl^*$	47.22	4.62	3.67	4.65
Iresinin I Isoiresinin I	$C_{36}H_{42}O_{23}N_2HCl^*$	47.66	4.78	3.09	3.91
Phylloactin Isophylloactin	$C_{27}H_{28}O_{16}N_2HCl^*$	48.19	4.34	4.16	5.27

* Calculated as hydrochloride on the basis of chemical structures reported in the literatures.

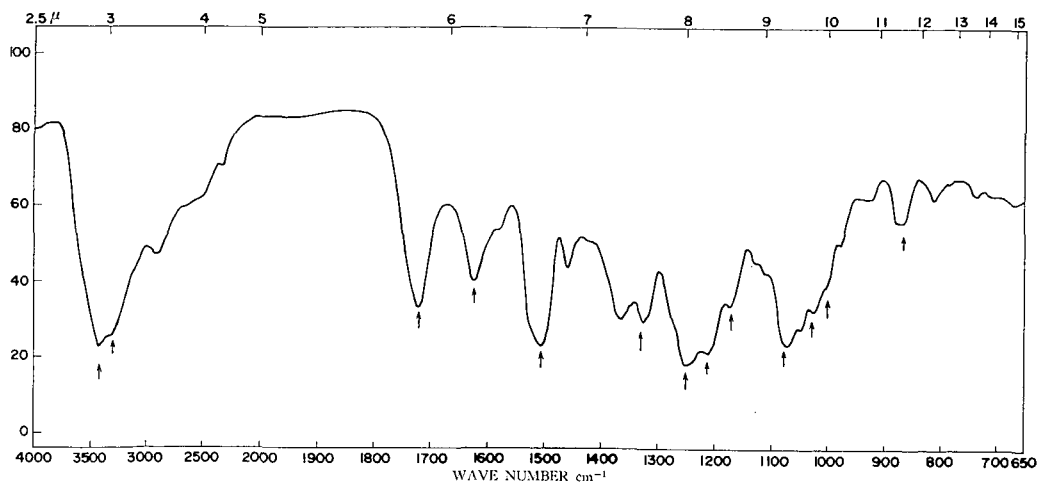


Fig. 3. IR Spectrum of *Salicornia* Pigment (KBr).

結晶を“*Salicornia* pigment”と略称する。これはあっけしうから色素を結晶状に単離した最初の例である。

単離した色素結晶は真空デシケーターに入れ、冷蔵庫(0~4°C)あるいはストッカー(-20°C)中に保存した。

一方、カラム中には難溶性の微量の橙黄色色素が残留した。

紫赤色色素の物理・化学的性質:

単離した紫赤色色素の一般的性質および呈色反応とERDMANN反応の実験結果を表にまとめた(Table 8, Table 9)。

また元素分析および機器分析の結果はそれぞれ図と表で示した(Fig. 2, Table 10, Fig. 3, Fig. 4)。

Salicornia pigmentの結晶は易水溶性で大部分の有機溶媒には不溶であり(Table 8), さらに後で詳述するように溶液状態では熱, および空気に対して不安定であった。種々の呈色反応および水・アミルアルコール間の分配は, Anthocyaninのそれとは全く異なっており, Betacyanin色素に特有の性質を示した(Table 9)。

これによりこの色素はBetacyanin類の一つであるこ

とがわかった。

UV ($\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$) (Fig. 2) では538 m μ (ϵ 81,400)と270 m μ (ϵ 11,700)に吸収極大, 295~300 m μ (ϵ 10,200)に肩が示され, Betacyaninの一種Betaninの吸収スペクトルとよく一致した。これらの吸収は一般にBetacyanin類に特徴的な吸収であるから, 従って*Salicornia* pigmentも同じ発色団をもつ色素であろうと推定された。

元素分析の結果はC 47.82, H 4.96, N 3.24, Cl 4.60%を示したが(Table 10), 今までに構造の推定または確定したものの6種と比較してみると, *Salicornia* pigmentの分析値はAmarantinとIresinin-I(あるいはそれぞれのイソ型)によく似ており, これらの色素のうちいずれか, あるいはこれと類縁構造をもつ色素の1種と推定された。

IR ν_{max} (KBr) (Fig. 3) では3420, 3300, 1720, 1623, 1504, 1330, 1250, 1212, 1170, 1080, 1030, 1000, 866 cm^{-1} の主な吸収を示し, この中3420と3300 cm^{-1} (OH, NH基), 2900 cm^{-1} (CH), 1720 cm^{-1} (C=O基), 1623 cm^{-1} および1504 cm^{-1} に強い吸収があった。これらの

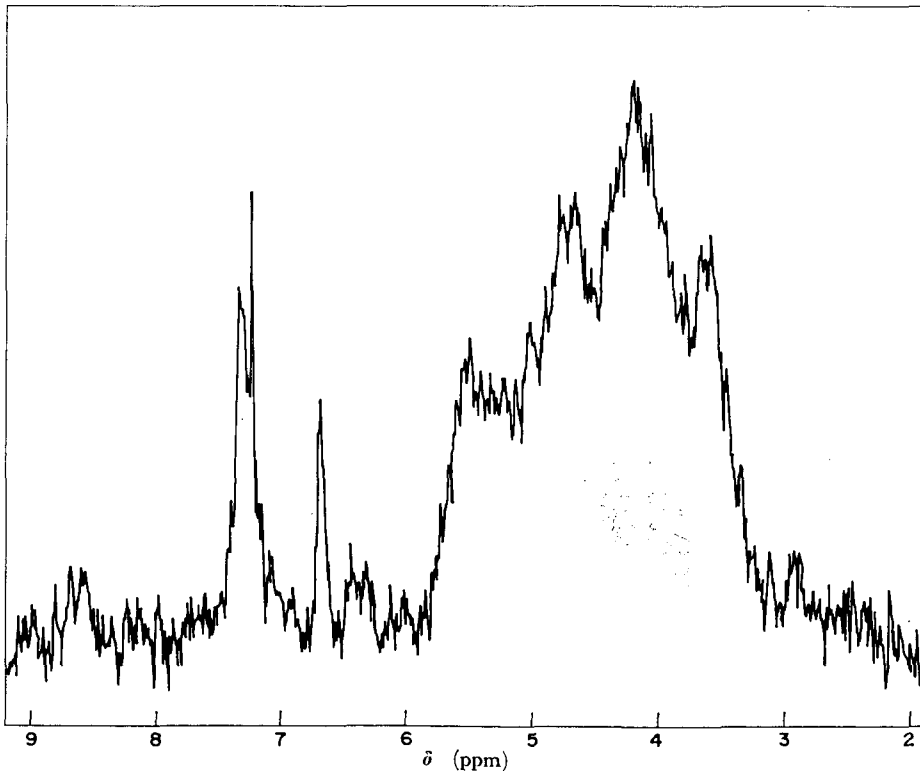


Fig. 4. NMR Spectrum of *Salicornia* Pigment in CF_3COOH at 100 MHz (TMS).

吸収はこれ迄報告された Betacyanin^{73,76,77} の吸収 (図中に矢印で示した) と共通の吸収, 即ち Betacyanin 類の特性吸収をもつことが明らかにされた。このことから *Salicornia* pigment は Betacyanin 類に属する色素であることは明らかである。

NMR (Fig. 4) では極めて複雑なパターンを示し, それぞれのピークの帰属は非常に困難であった。このことは後でわかったことであるが, 後述するようにこの色素は配糖体であるため, 糖の OH プロトン, メチレン, メチンプロトンが重なりあっていることによるものと考えられる。唯, δ 3 ppm 以下の高磁場にシグナルがないことから, 脂肪族メチル等の存在が否定される一方, δ 6.5 ~ 9.0 ppm の間にビニルプロトンと芳香環プロトンの存在が推定された。

以上の各実験により単離した *Salicornia* pigment は Betacyanin 類の一つであり, Amarantin, Iresinin-I, あるいはそれらと類縁の色素であろうと推定した。

黄色色素の物理・化学的性質:

先の色素の抽出・単離のところで述べたポリアミドカ

ラムで紫赤色色素より先に溶出して来た黄色色素フラクションは蒸発乾固すると黄色非晶物を与えた。このものは UV (Fig. 5) の吸収波長から Betaxanthin の一種と推定されたが, 非常に微量のためこれ以上の精査は行なわなかった。

またカラム中に残留した橙黄色色素フラクションは同様非常に微量であったため精査は不可能であった。

第3節 色素のアグリコン部の構造決定

3-1 色素の部分加水分解

現在までに構造の確認されている Betacyanin 類はすべて配糖体の形で存在していることがわかっているので, 先ずアグリコン部の同定を行なうため先に単離した *Salicornia* pigment の部分加水分解を行ない, 生成物の PC と PE による検索を試みた。

<実験>

供試試料:

あっけしそうから単離した *Salicornia* pigment の結晶。

PC: 濾紙; 東洋濾紙 No. 51

溶媒; (A) 0.1 M Formic acid (pH 2.4)

(B) 0.05 M Pyridine-formic acid (pH 4.5)

(C) n-Butanol-acetic acid-water (4:1:2, v/v)

移動度; Betanin の移動度に対する比移動度 RB で示した。

PE: 装置; 小林式濾紙電気泳動 SA 型

濾紙; Whatmann No. 1 濾紙, あるいは東洋濾紙 No. 51

泳動条件; 400 V, 電位勾配 16 V/cm, 1時間
緩衝液; PC の場合の (A), (B), (C) に同じ

移動度; Betanin の泳動度に対する比泳動度 EB であらわした。

部分加水分解の方法:

Salicornia pigment (5 mg) を 1N HCl (4 ml) に溶解, 80°C で 30 分間加熱し部分加水分解を行ない, 冷却後, 反応混液を Dowex 50 W-X2 (H+ 型) カラムに吸着させ, 0.1% HCl で洗浄してのち, 水で溶出する方法で精製し, 部分加水分解生成色素の検出用試料とした。

対照に用いた Betanin の部分加水分解の場合も同一の方法によった。

<実験結果と検討>

部分加水分解生成物を, 純品の Betanin, Betanidin, および Betanin の部分加水分解生成物と並べて, PC

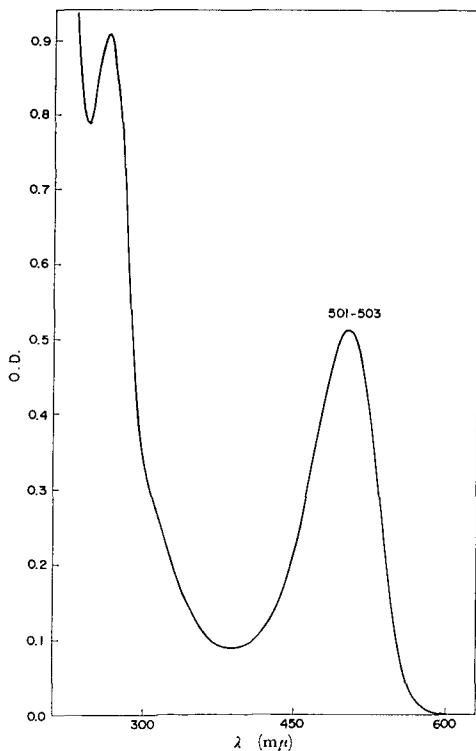


Fig. 5. UV Spectrum of Yellow Pigment of *Salicornia europaea* L. (in Citric acid-acidic H₂O).

Table 11. Paper Chromatography and Paper Electrophoresis of *Salicornia* Pigment and its Partial Hydrolyzates

Pigment	PC (RB)*)			PE (EB)*)		
	A	B	C	A	B	C
<i>Salicornia</i> pigment	2.50	1.54	0.19	1.50	1.22	1.23
Pigments produced by partial hydrolysis of <i>Salicornia</i> pigment	(1) 2.50 (2) 1.24 (3) 0.17	1.54 1.02 0.19	0.19 1.02 2.56	1.50 0.99 0.47	1.22 1.00 1.03	1.23 1.00 0.97
Betanin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Betanidin	0.17	0.19	2.56	0.47	1.04	0.97
Pigments produced by partial hydrolysis of betanin	(2') 1.18 (3') 0.18	1.02 0.17	1.03 2.53	0.99 0.49	0.99 1.03	1.01 0.97

*) RB, Relative Rf-value (Betanin=1.00)

Solvent systems: A) 0.1 M Formic acid (pH 2.4)

B) 0.05 M Pyridine-formic acid (pH 4.5)

C) *n*-Butanol-acetic acid-water (4:1:2, v/v)

**) EB, Relative electrophoretic mobility (Betanin=1.00)

と PE を行なったところ表に示す結果が得られた (Table 11)。

表からわかるように *Salicornia* pigment の部分加水分解物は PC, PE で三つの赤紫色のスポットを与えた。このうちスポット (1) は未分解色素であり、スポット (2) は Betanin (Betanidin-5-O-β-D-glucopyranoside), スポット (3) は Betanin のアグリコンである Betanidin に相当するものと推定された。従って *Salicornia* pigment のアグリコン部は既知の Betacyanin 類の場合と同様に Betanidin であることがわかった。

さらに Betanin に一致するスポットが検出されたことから、このアグリコン部にはグルコースが直接結合していることがわかり、また未分解のまま残留した *Salicornia* pigment の各種溶媒での PC, PE における移動度から考えて、この色素は Betanin よりもより分子サイズが大きく、さらにもう 1 個 (あるいはそれ以上) の糖、あるいは他の化合物が結合しているものと推定された。

3-2 アグリコンの単離と構造解析

前述の *Salicornia* pigment の部分酸加水分解物の検索によってそのアグリコン部は Betanidin と推定できたことから、これをより精査するためにアグリコンを単離、精製し、塩酸塩の形で取得し、その諸性質を調べ構造解析を試みた。

<実験>

アグリコンの単離:

Salicornia pigment 結晶 655 mg を濃塩酸 120 ml に

溶解し、脱気後 35°C で 5 時間注意深く加温加水分解し、反応混液を 30°C で減圧濃縮乾固した。これを水 500 ml に溶解し、Dowex 50 W-X2 (H⁺ 型) カラム (φ2×10 cm) に吸着、0.1% HCl 1 ℓ で洗浄後、水で溶出し、アグリコン相当色素フラクションを減圧濃縮し、低温室に静置、生成した結晶を稀塩酸から再結、紫色針状結晶 (80 mg) を得た。

元素分析, UV, IR, NMR: 第 2 節記載の方法に同じ。

<実験結果と考察>

Salicornia pigment の酸加水分解によって得られたアグリコンの塩酸塩の元素分析の結果 (Table 12) は Betanidin 塩酸塩 [C₁₈H₁₇O₈N₂Cl·1/2 (or 1) H₂O] に一致した。

UV (Fig. 6) では、もとの *Salicornia* pigment とほとんど同じ λ_{max} (542-546, 271-272, 295(肩) mμ) を示したことから、糖部をはずしても色素の Chromophore には変化が起きないことが明らかにされた。

また IR (Fig. 7) では水酸基 (3400 cm⁻¹), カルボニル基 (1720 cm⁻¹) の吸収が顕著に観察され、また各吸収のパターンは Betanin から得られたアグリコンの文献既報のパターンのそれにほぼ一致することが確かめられた。

NMR (Fig. 8) は *Salicornia* pigment そのもののスペクトルよりはより複雑ではないパターンを与えたが、十分な解析は困難と判断されたので、ここではスペクトル図をあげるに止める。しかし、このパターンは文献記載³²⁾ の Betanidin HCl 塩のスペクトルパターン、および Chemical shift と一致したことから取得したアグリ

Table 12. Elementary Analyses of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment

	C%	H%	N%	Cl%
Analysis 1				
Found	49.88	4.38	6.38	7.65
Calcd. for $C_{18}H_{17}O_8N_2Cl \cdot \frac{1}{2} H_2O$	49.82	4.15	6.46	8.19
Analysis 2				
Found	48.86	3.95	6.11	7.56
Calcd. for $C_{18}H_{17}O_8N_2Cl \cdot H_2O$	48.81	3.84	6.32	8.02

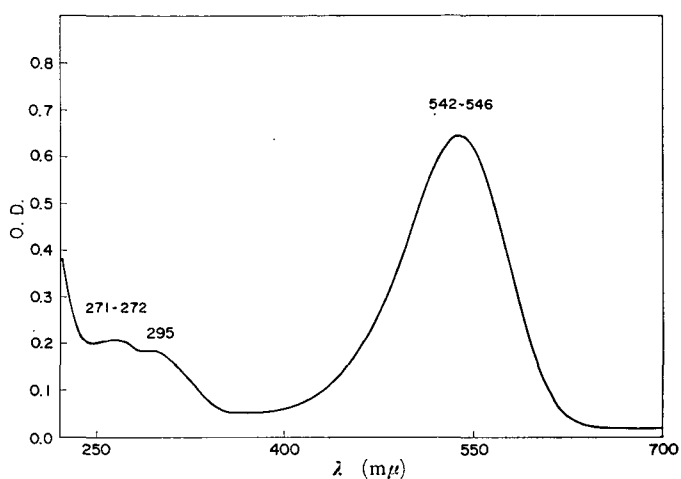


Fig. 6. UV Spectrum of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment (H_2O).

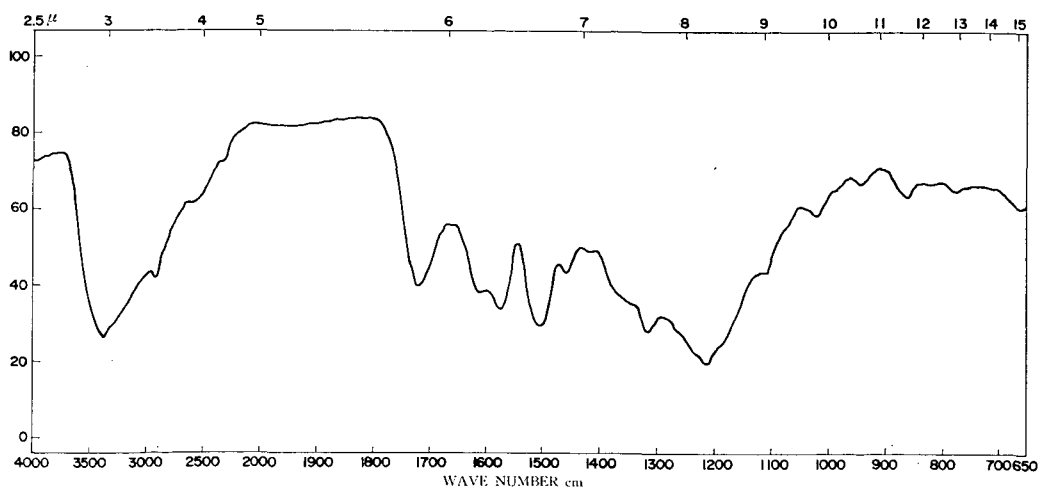


Fig. 7. IR Spectrum of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment (KBr).

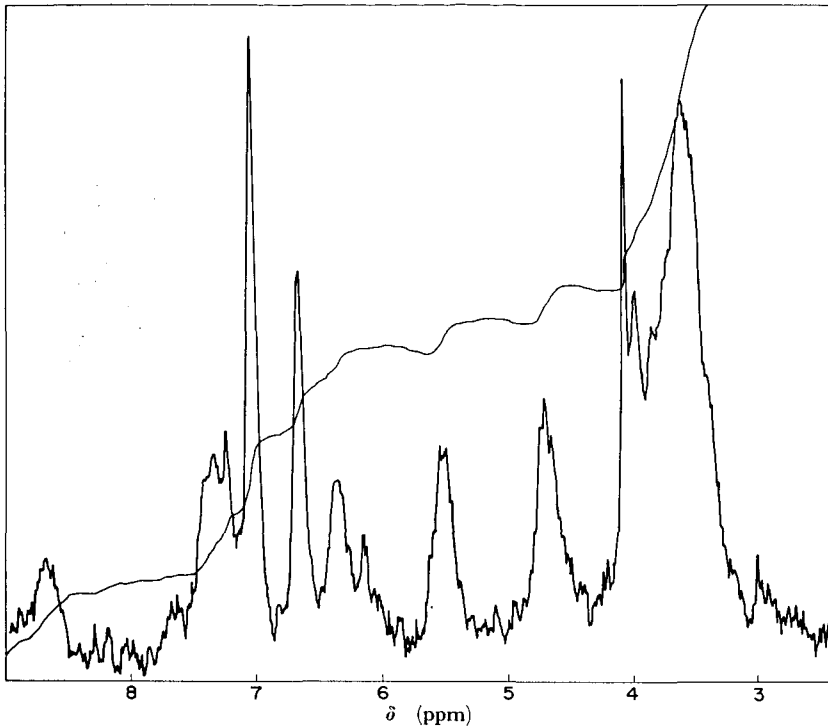


Fig. 8. NMR Spectrum of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment in CF_3COOH at 100 MHz (TMS).

コンは、これと同じ構造をもつものと推定された。

3-3 アグリコンのメチル化物の合成と構造解析

前述のように取得したアグリコン塩酸塩の分析のみではアグリコンの同定不十分と考えたため、次にアグリコン塩酸塩のメチル化による Neo 構造への転換生成物の構造解析を試みた。

この場合、メチル化の方法は MABRY, WYLER^{31,32)}の方法に準じて行ない、メチル化物の構造解析には UV, IR の他、この種の化合物の研究では従来報告のなかった MS (質量スペクトル) におけるフラグメンテーションからの解析、および NMR (Spin decoupling を含む) による解析を行なった。

<実験>

アグリコン塩酸塩のメチル化:

アグリコン塩酸塩 (100 mg) を乾燥 MeOH (50 ml) に溶解し、 0°C に冷却、Diazomethane (Diazald 7 g から合成) エーテル溶液を添加し、一夜 10°C 以下に静置した後、減圧濃縮し得られた黄色残渣をジクロロメタン (5 ml) に溶解、アルミナ (酸洗浄し、活性度 II としたもの) カラム ($\phi 1.5 \times 10$ cm) に吸着、ジクロロメタンで黄色

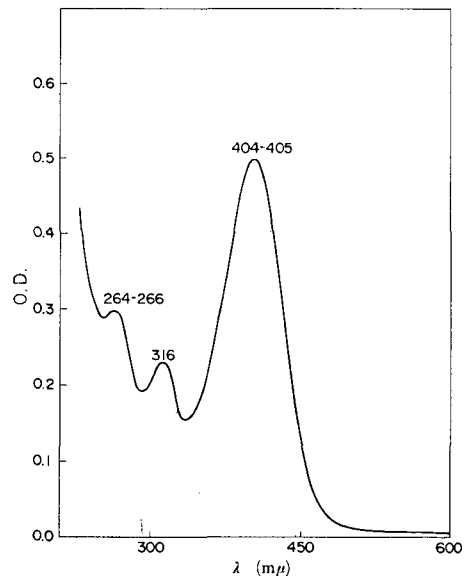


Fig. 9. UV Spectrum of Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment (EtOH).

バンドを溶出，溶出液を減圧濃縮し，残渣を MeOH-CH₂Cl₂ から再結して，橙黄色針状結晶 (25 mg, m.p. 253.5~254°C) を得た (Photo. 4 参照)。

Betanidin 塩酸塩のメチル化：

赤ビートから単離した Betanidin-塩酸塩純品を同様にしてメチル化してメチル化物 (5,6-Di-O-methyl neobetanidin trimethyl ester) に変え，再結して得た橙黄色針状結晶 (m.p. 254°C) を対照に使用した。

融点，元素分析，UV，IR： 測定法は前項に同じ。

NMR： 前項に同じだが，さらに各プロトンの帰属のため，Proton spin decoupling 法を試みた。

質量スペクトル (以下 MS と略記)：

北海道大学農学部農芸化学科農業化学教室に依頼

し測定した。各試料の測定条件は図中に表示した。

<実験結果と考察>

得られたメチル化物の結晶の元素分析の結果 (Table 13), 5,6-Di-O-methyl neobetanidin trimethylester [C₂₃H₂₄N₂O₈·H₂O] と一致し，また MS では親ピーク (M⁺, m/e 456) が見出され理論分子量に一致した (Fig.

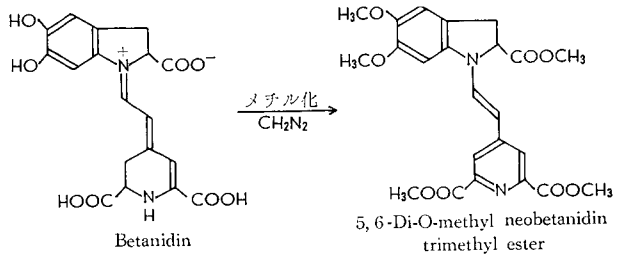


Table 13. Properties of Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment

		C%	H%	N%
Elementary Analysis	Found.	58.98	5.23	5.95
	Calcd. for C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₈ ·H ₂ O	58.22	5.52	5.90
UV λ ^{max} (mμ)	MeOH	404-405, 316, 264-266		
	MeOH+H ⁺	513-514, 315, 275(sh), 258		
IR ν _{max} (cm ⁻¹) (KBr)		3460, 2950, 1742, 1720, 1640, 1597, 1515, 1470,		
		1440, 1361, 1333, 1308, 1270, 1256, 1210, 1194,		
		1119, 996, 801		

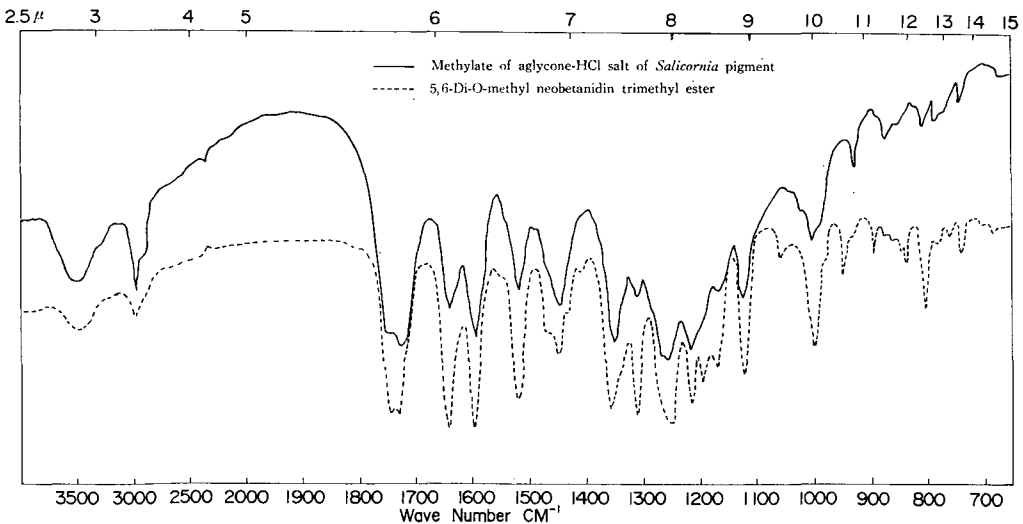


Fig. 10. IR Spectra of Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment and Synthesized 5,6-Di-O-Methyl neobetanidin trimethyl ester (KBr).

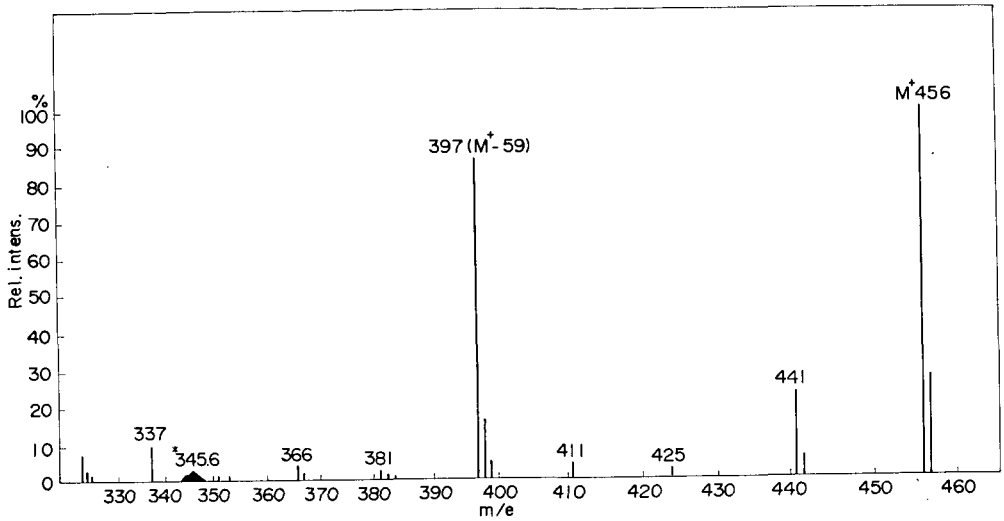


Fig. 11. MS Spectrum of Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment.

11, Fig. 12).

メチル化物の UV (Table 13, Fig. 9) および IR における吸収 (Fig. 10, Table 13) は合成した 5,6-Di-O-methyl neobetandin trimethyl ester の吸収値と一致

し Neobetandin 構造に変化したことを示していた。

このメチル化物の MS (Fig. 11) では親ピーク (M^+) に相当するピーク m/e 456 が検出されたが、他のピークの帰属は、準安定ピークによる計算や後出の項で述べる関連化合物の MS との比較によって行ない、各フラグメントの開裂様式を推定し、ほとんど全てのピークを合理的に解明することができた (Fig. 12)。

これによりこのメチル化物は 5,6-Di-O-methyl neobetandin trimethyl ester であることは間違いないものと思われるが、さらに Neo 構造に変化させたことによって有機溶媒 ($CDCl_3$ 等) に易溶になるとともに NMR スペクトルの各シグナルが明瞭となり、その帰属が可能になった。

NMR-シグナルの帰属は、後述する合成アグリコン関連化合物の NMR-シグナル値および MABRY, WYLER³²⁾, WILCOX, WYLER ら⁶⁹⁾ の研究を参考にし、また Spin decoupling 法を応用して行なった (Fig. 13, Fig. 14, Table 14)。

先ず NMR-シグナルの検討に当って次のように化合物を略記する。

- (I): *Salicornia* pigment のアグリコンの塩酸塩のメチル化物
- (II): O, O, N-Triacetylcyclodopamethylester
- (III): 4-Chloropyridine 2,6-dicarboxylic acid dimethylester
- (IV): (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethylester

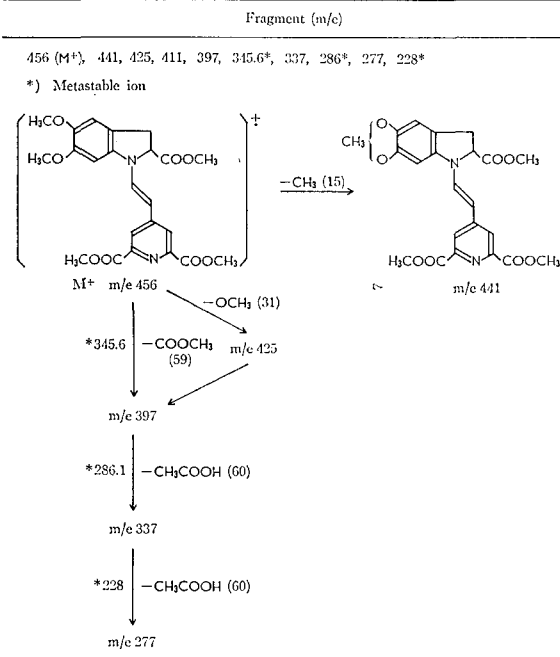


Fig. 12. Estimated Fragmentation-Pathway of Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment.

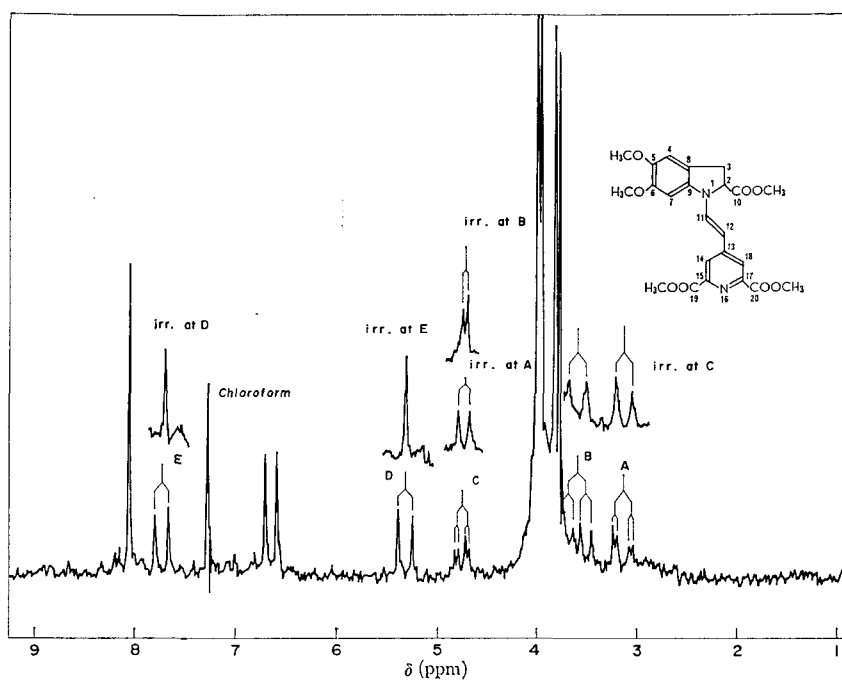


Fig. 13. NMR Spectrum of Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment (100 MHz, $CDCl_3$).

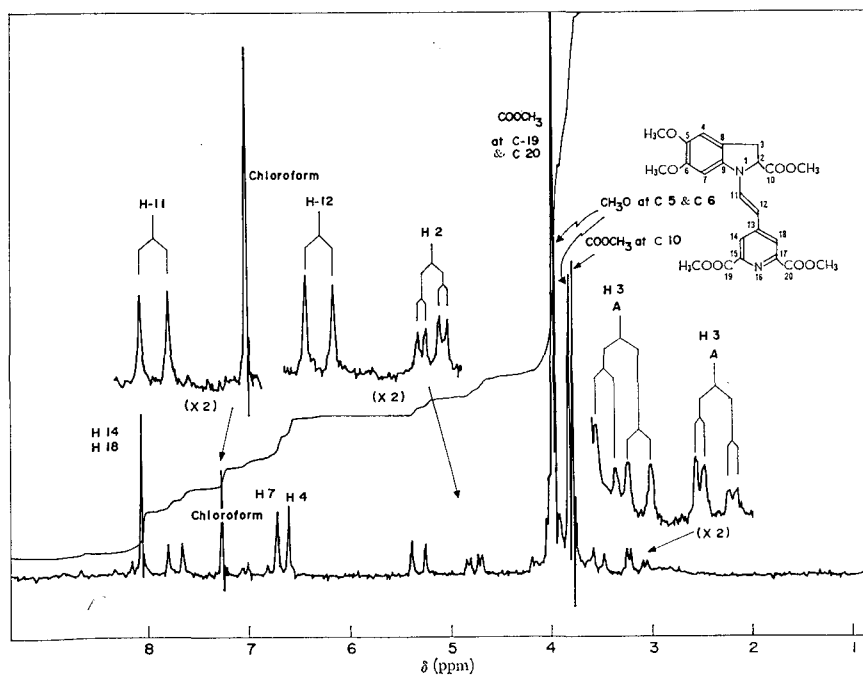
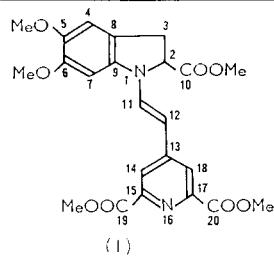
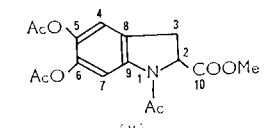
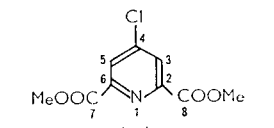
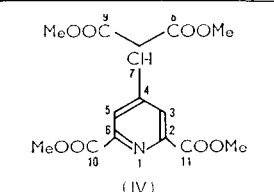


Fig. 14. NMR Spectrum of Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment (100 MHz, $CDCl_3$).

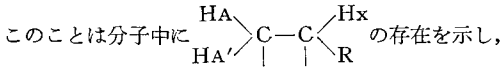
Table 14. Assignment of NMR-signals of Methylate of Aglycone-HCl Salt of *Salicornia* Pigment (ppm, CDCl₃, TMS)

Compound	Indoline part					Vinyl part		Pyridine part		Methoxyl		Ester methoxyl	
	H-2	H-3	H-4	H-7		H-11	H-12	H-14	H-18	C-5	C-6	C-10	C-19 C-20
 <p>(I)</p>	4.79	3.15	3.63	6.60	6.72	7.73	5.32	8.08		3.97	3.83	3.79	4.02
	dd	dd	dd	s	s	d	d	s		s	s	s	s
	J=10, 5 J=17, 5 J=17, 10 Assigned by spin decoupling					J=14 J=14 Assigned by spin decoupling							
 <p>(II)</p>	4.93	3.20	3.50	7.02	8.12					O-Ac		N-Ac	
	bm	bd	bd	s	s					2.28	2.32	3.73	2.4 2.1
										s	s	s	s s
 <p>(III)</p>								C-3	C-5			C-8	C-9
								8.3					4.02
								s					s
 <p>(IV)</p>						C-7		C-3	C-5			C-8	C-10
						4.81		8.39				3.80	4.01
						s		s				s	s

Remarks: s, singlet; d, doublet; dd, double doublets; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; b, broad.

i) 化合物(I)の Indoline 部プロトンの帰属

(I)の NMR (Fig. 13) に示したように (C) δ 4.79 ppm/dd の位置を照射すると (A) 3.15 ppm/dd ($J=17, 5$ Hz), (B) 3.63 ppm/dd ($J=17, 10$ Hz) のシグナルは doublet ($J=17$ Hz) に変化し, 逆に (A) と (B) をそれぞれ照射すると (C) のシグナルは $J=10$ Hz と $J=5$ Hz の doublet に変化した。



4.79 ppm は (I) の Indoline 核の C-2 位, 3.15 ppm と 3.63 ppm は C-3 位の二つのプロトンに帰属され, 典型的な ABX 型を示した。また, これらは化合物(II)の C-2, C-3 位プロトンの δ 値からも類推された (Table 14)。

その他の Indoline 部プロトンは (II) のそれとの対比, 考察によりそれぞれ帰属された。

ii) 化合物(I)の Vinyl 基プロトンの帰属

(I) の 7.73 ppm と 5.32 ppm の doublet ($J=14$ Hz) を互に照射すると (Fig. 13), どちらも singlet に変化した。この結果はビニル基の存在を示し, J の大きさから互に trans 位の構造をとることが明らかとなり, 7.73 ppm/d は C-11 位プロトン, 5.32 ppm/d は C-12 位プロトンに帰属された。

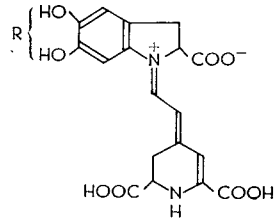
iii) 化合物(I)の Pyridine 環部プロトンの帰属

(I) の 8.08 ppm/s は (III) および (IV) における 8.3ppm ~ 8.39 ppm/s との対比から C-14, C-18 位のプロトンに帰属され (Table 14), また 4.02 ppm/s も同様 (III), (IV) の 4.01 ~ 4.05 ppm/s との対比から C-19, C-20 位の COOCH₃ プロトンに帰属された。

以上 NMR の検討の結果からも *Salicornia* pigment のアグリコンの HCl 塩のメチル化物の構造は 5, 6-Di-O-methyl neobetainidin trimethyl ester [Table 14 の

化合物(I)] と同定された。

以上の 3-1 より 3-3 項までの各実験の結果, あっけしその紫赤色色素のアグリコン部は下図の構造をもつ Betanidin であることが確認され, この C-5 位および C-6 位にある二つの OH 基のいずれかに糖部が結合している化合物であろうと推定された。



Aglycone of *Salicornia* Pigment (Betanidin)

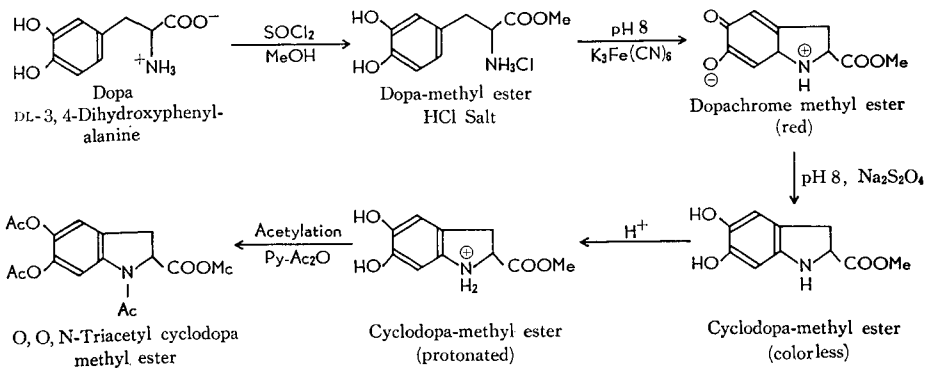
R: Sugar moiety

3-4 アグリコン部関連化合物の合成

Salicornia pigment の塩酸塩のメチル化物の構造解析における MS および NMR の検討のための比較物質として用いるため O, O, N-Triacetylcyclodopa methyl ester, 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid dimethyl ester と (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester とを合成し, これらの合成物の諸性質, とくに MS と NMR 的性質についてはより詳細に調べた。

3-4-1: O, O, N-Triacetyl cyclodopa methyl ester の合成

O, O, N-Triacetyl cyclodopa methyl ester は WYLER らの行なった方法⁷⁰⁾ を参考にして次の経路により合成した。



<実験>

DL-Dopa (DL-3,4-Dihydroxy phenylalanine) (1 g) を Thionyl chloride-メタノール混液 [Thionyl chloride (5 ml) をメタノール (20 ml) に冷却 (-20°C) 下, 滴下した溶液] に添加し, 2時間室温に静置後, 逆流冷却下煮沸した。反応混液を減圧濃縮し生成した結晶をメタノールから再結し, m.p. 150~154°C の白色粒状物として Dopamethyl ester HCl 塩 (333 mg) を得た。

このようにして合成した Dopamethylester HCl 塩 (500 mg) を Sørensen-phosphate buffer (KH₂PO₄ 0.5 g + NaHPO₄·2H₂O 22.6 g/l, pH 8) (150 ml) に溶解し, 攪拌しながら Potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) (4.075 g) と Sørensen-phosphate buffer (100 ml) の混合液を添加すると瞬時, 赤色化 (Dopachrome methyl-ester の生成) するので, 5~6 秒後に使用直前に調製した Sodium dithionite (Na₂S₂O₄) 溶液 (2.75 g/Sørensen phosphate buffer 50 ml) を加えて, 還元すると液色は

淡黄色に変化した。この溶液に濃塩酸 (5 ml) を添加し, 減圧乾固し, P₂O₅ 中でよく乾燥して乾固物を得た。

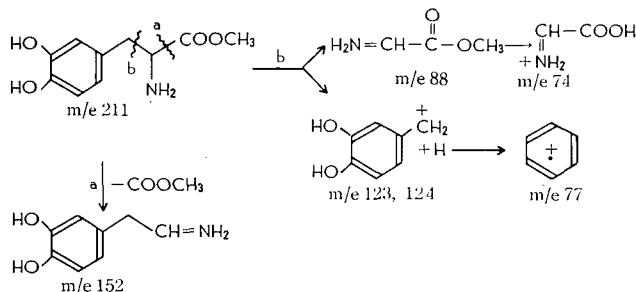
次にこれを細かく粉碎し, 無水酢酸 (25 ml) と無水ピリジン (25 ml) を加え, 4時間よく攪拌してアセチル化した後, 濾過し, Methylene chloride で洗浄した。濾液と洗液を合わせ, 溶媒を除去し, 残渣に 0.5 N HCl (50 ml) と Methylene chloride (50 ml) を添加, 分液漏斗で振盪抽出し, Methylene chloride 層を Sodium hydrogen carbonate 水溶液, 次いで水で洗浄後, 溶媒を留去し淡黄色残渣を得た。

この残渣をワコーゲル C-200 カラム (担体 80 g, φ 2.8 × 35 cm) に吸着, Methylene chloride-methanol (19:1, v/v) で展開, フラクションコレクターで溶出液を 5 ml ずつ分取した。各フラクションのうち, TLC (溶媒: Methylene chloride-methanol, 19:1, v/v) で R_f 0.70 を示すフラクションを集め, 溶媒を留去後, Methylene chloride-methanol から再結し, m.p. 156~157°C の無

Table 15. Properties of Synthesized DL-Dopa methyl ester HCl salt

Elementary Analysis	Found	Calcd. for C ₁₀ H ₁₃ O ₄ N HCl	C%	H%	N%	Cl%
UV (mμ)	λ _{max} 210, 280, λ _{min} 215					
IR (cm ⁻¹) (KBr)	3500 (s*), 3430 (s), 3200 (s), 2950 (bs), 1720 (s), 1605 (s), 1525 (s), 1440 (s), 1385 (m), 1365 (m), 1295 (s), 1270 (m)					
MS (m/e)	211 (M ⁺), 152, 124, 123, 88, 77, 74					

Estimated Pathway of Fragmentation



NMR δ (ppm)	7.30/m (2 H, NH ₂)
90 MHz, CF ₃ COOH	7.1-6.8 (3 H, benzene ring)
	4.6/m (1 H, H-C 8)
	4.02/s (3 H, COOCH ₃)
	3.35/m (2 H, H-C 7)

* (IR) s: strong, (m): medium, w: weak.

色針状結晶 (85.1 mg) を得た。

融点, 元素分析, UV, IR, MS, NMR: 測定法は前項に同じ。

<実験結果と考察>

合成した Dopamethyl ester HCl 塩の元素分析値, UV, IR, MS (主なフラグメントの開裂様式を含む), および NMR (プロトン帰属を含む) 的諸性質は一括して表に載せたが (Table 15), 元素分析値は理論値に合致し, MS における親ピーク, 開裂様式, NMR における

各プロトンの合理的な帰属などから, 合成した物質は目的とする Dopamethyl ester HCl 塩であることが確かめられた。

また合成した O, O, N-Triacetyl cyclodopa methyl ester の UV, IR, MS, NMR 測定の結果は図示した (Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17, Fig. 18)。またこれらスペクトルの数値と元素分析値は一括作表してあげてある (Table 16)。表中にはさらに MS における開裂様式を meta stable ion からの計算などによって推定して挿入してある。

この中, NMR (Fig. 18 および Table 16) で C-4, C-7 の芳香環プロトン数の割当が 1:1 にならず 1.35:0.65 の比を示しているが, このことは WYLER ら⁷⁰⁾ が述べているように Rotamer (A) と (B) が溶媒中で 0.7:0.3 の比で平衡して存在すること, また Amide 結合のまわりの

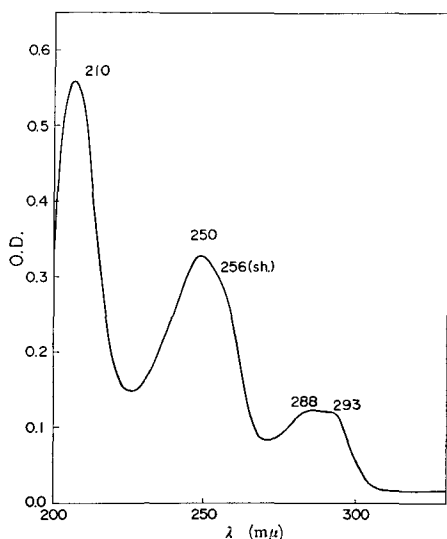
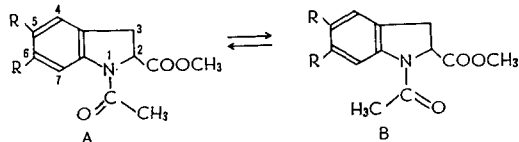


Fig. 15. UV Spectrum of Synthesized O, O, N-Triacetyl cyclodopa methyl ester (MeOH).



回転障害による異方性効果のため, C-7のプロトンは (A) の場合より (B) の方が高磁場 (約 1 ppm) にシフトし, C-4のプロトンに重なることによるとされており, 同様に N-Ac プロトンに帰属されるシグナルが約 1:2 の比で δ 2.4 ppm と 2.1 ppm の 2 箇所に見られることから (A)(B) 両混合物の存在が示された。

かくして, 合成物の元素分析値は O, O, N-Triacetyl cyclodopa methyl ester の理論値に合致し, MS, NMR

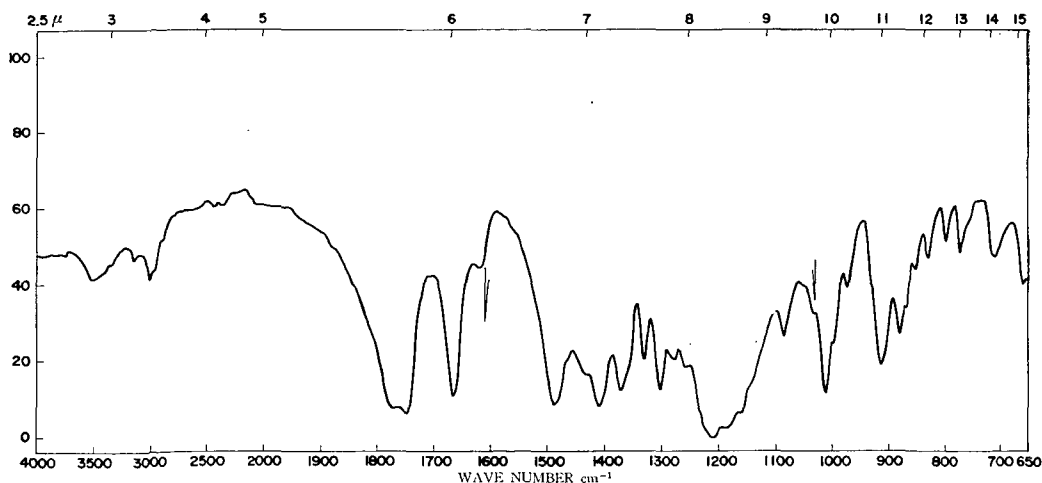


Fig. 16. IR Spectrum of Synthesized O, O, N-Triacetyl cyclodopa methyl ester (KBr).

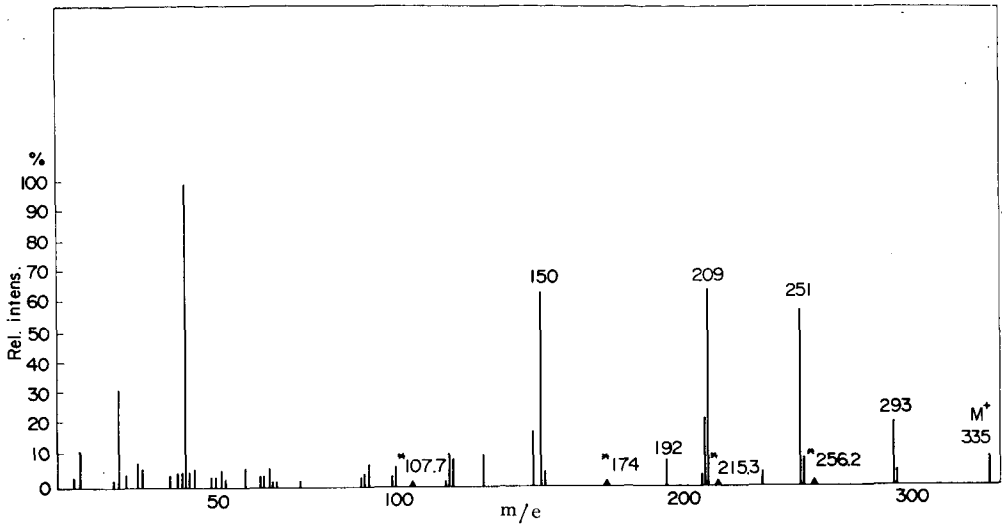


Fig. 17. MS Spectrum of Synthesized O, O, N-Triacetyl cyclodopa methyl ester.

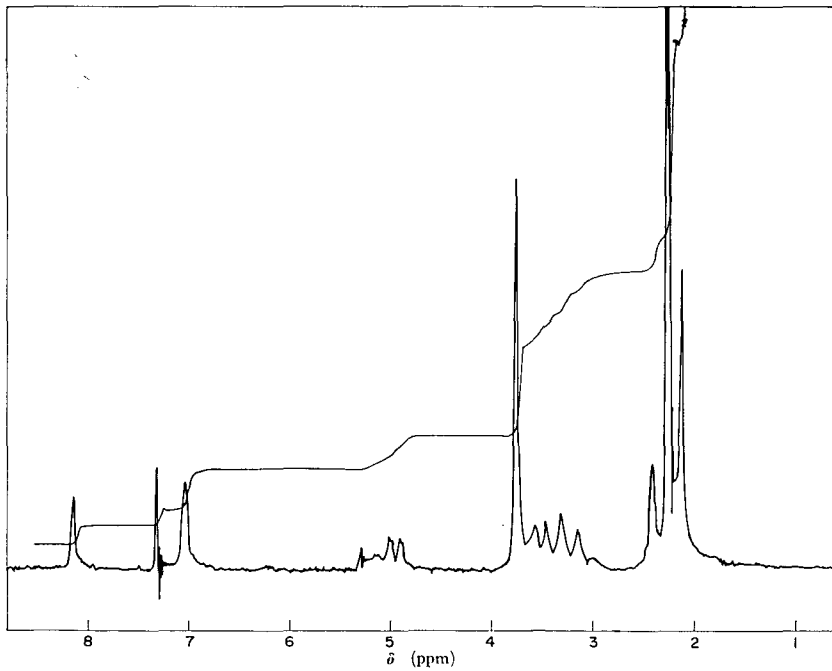


Fig. 18. NMR Spectrum of Synthesized O, O, N-Triacetyl cyclodopa methyl ester (100 MHz, CDCl₃).

等のデータの検討によってもこれが合成目的物に一致することが確かめられた。

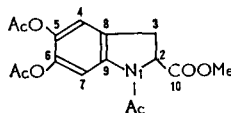
3-4-2: 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid dimethyl ester と (2,6-Dicarboxy-4-

pyridyl) malonic acid tetramethyl ester の合成

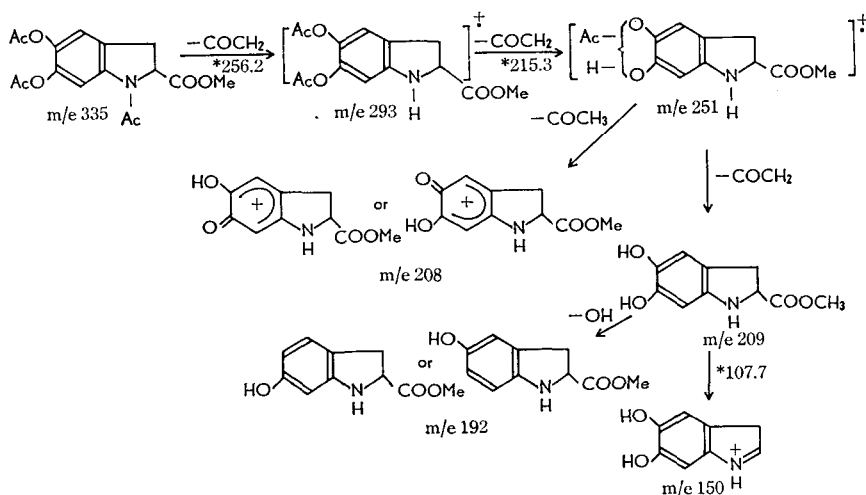
先ず Chelidonic acid を BLATT の著書⁴⁾ 記載の方法で合成し、これを RIEGEL らの方法⁶²⁾ に従い Cheli-

Table 16. Properties of Synthesized O,O,N-Triacetyl cyclodopa methyl ester

		C%	H%	N%
Anal.	Found	56.81	4.97	4.05
	Calcd. for. C ₁₆ H ₁₇ NO ₇	57.31	5.11	4.18
UV λ _{max} (mμ) (MeOH)	210, 250, 288, sh. 256, 293			
IR ν _{max} (cm ⁻¹)	1775 (s), 1750 (s), 1665 (s), 1620 (w), 1490 (s), 1430 (w), 1410 (s), 1370 (s), 1330 (s), 1300 (s), 1210 (bs), 1180 (bs), 1160 (bs), 1080 (m), 1010 (s)			
MS (m/e)	335 (M ⁺), 293, *256.2, 251, 215.3, 209, 192, *174, 150			
NMR δ (ppm)	8.12/s	(0.65 H, part of H 7)		
	7.02/s	(1.35 H, part of H 7 and H 4)		
	4.93/bd	(1 H, H-C 2)		
	3.73/s	(3 H, COOCH ₃)		
	3.50/bd	(1 H, H-C 3)		
	3.20/bd	(1 H, H-C 3)		
	2.28/s	(6 H, 2×OCOCH ₃)		
	2.32/s			
	2.4/s	1 H	N-COCH ₃	
2.1/s	2 H			

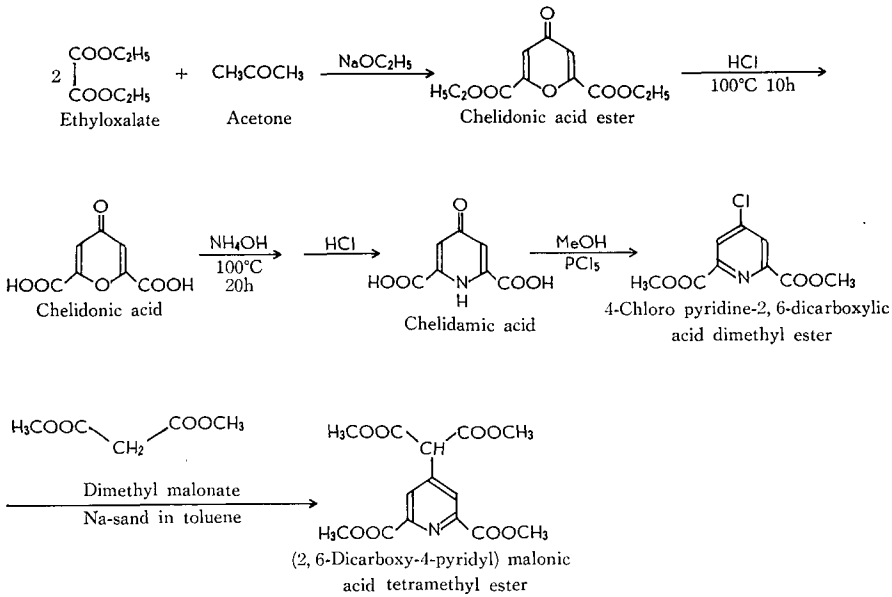


Estimated Fragmentation Pathway of
O,O,N-Triacetyl cyclodopa methyl ester



damic acid に変換し、次にこれを用い KOENIG らの方法²⁴⁾により 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid dimethyl ester を得た。

最後にこれを用いて同様 KOENIG らの方法²⁴⁾に準じて (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester を合成した。



<実験>

(1) 4-Chloropyridine-2, 6-dicarboxylic acid dimethyl ester の合成

Ethyloxalate (75 g) と特級アセトン (29 g) の混合液に前以って Na (22.5 g) とエタノール (250 g) から合成した Sodium ethoxide を二分し、その半量を添加すると発熱し、黄色ゼリー状に凝固する。5分後攪拌しながら Ethyloxalate (8.11 ml) を添加、加熱、2時間後、予め加温しておいた残り半量の Sodium ethoxide を攪拌しながら少量ずつ添加、1時間室温に静置後、エタノールを留去、黄褐色残渣を濃塩酸 (100 ml) と水 (400 g) の混合液に注加、2時間攪拌し、吸引濾過、冷水 (1500 ml) で洗浄、熱水から再結し、Chelidonic acid (195 g) を得た。

この Ester (25 g) を濃塩酸 (50 ml) に溶解し、還流冷却下、温浴上 10 時間加熱し、生成した橙色沈殿を吸引濾過、冷水 (100 ml) で洗浄、熱水から再結し Chelidonic acid (12.9 g) を得た。

この操作を数回くりかえして得た Chelidonic acid (30 g) を濃アンモニア水 (220 ml) に溶解、還流冷却下、温浴上 20 時間加熱後、塩酸で酸性にし、生成した沈殿を吸引濾過、冷水 (200 ml) で洗浄、熱水から再結し、Chelidamic acid (16 g) を得た。

次にこの Chelidamic acid (10.1 g) を 150°C で 2 時間乾燥し、乳鉢中で粉碎、PCl₅ (34 g) を添加、迅速に混合、温浴中で 2 時間加熱後、室温に静置。その濃褐色溶

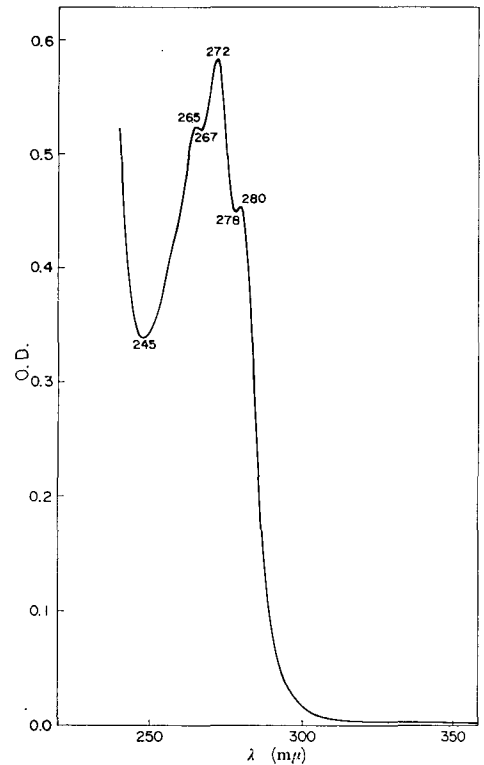


Fig. 19. UV Spectrum of Synthesized 4-Chloropyridine-2, 6-dicarboxylic acid dimethyl ester (MeOH).

液にクロロホルム (50 ml) を添加し、攪拌、水 (10 ml) を入れ、迅速に振盪抽出し、クロロホルム層を濾過し、無水メタノールを HCl の発生がなくなる迄注意深く添加、溶媒を留去し、熱メタノールから再結し、4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid dimethyl ester (5.75 g) を得た。

(2) (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester の合成

Na sand (0.8 g) と Toluene (110 ml) の混合液に Dimethylmalonate (5.3 ml) を添加、直ちに激しい反応が起こるので、反応が止んでから3時間、還流冷却下加

熱、続いて先に合成した Dimethyl ester (4.4 g) を添加、5時間還流冷却下加熱、Toluene を傾瀉して除去、残渣をトルエンで洗浄し、1NHCl を添加、エーテルで抽出、エーテル層を蒸発乾固し、熱メタノールから再結し、(2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester (480 mg) を得た。

(3) 融点、元素分析、UV、IR、MS、NMR :

測定法は前項と同じ。

<実験結果と考察>

合成取得物の UV、IR、MS、NMR はそれぞれ図示してある： 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid

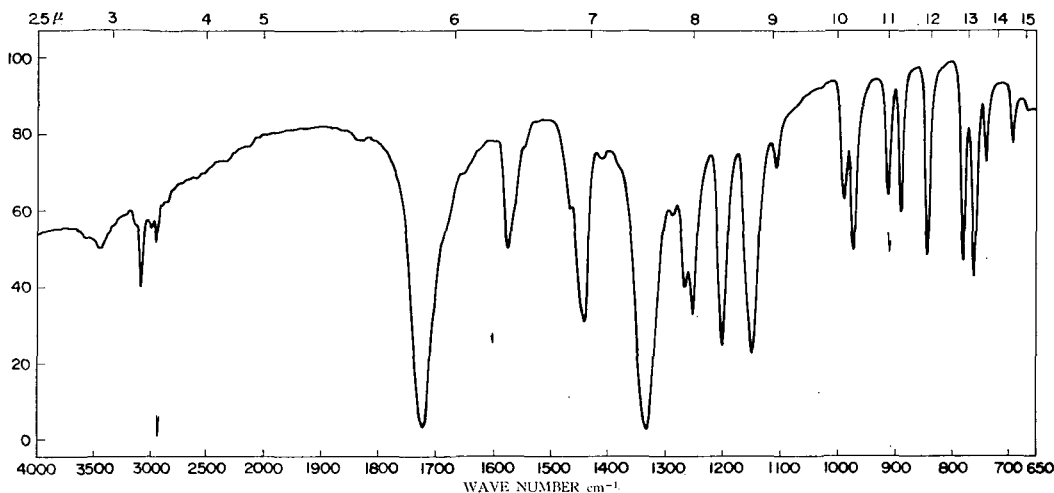


Fig. 20. IR Spectrum of 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid dimethyl ester. (KBr).

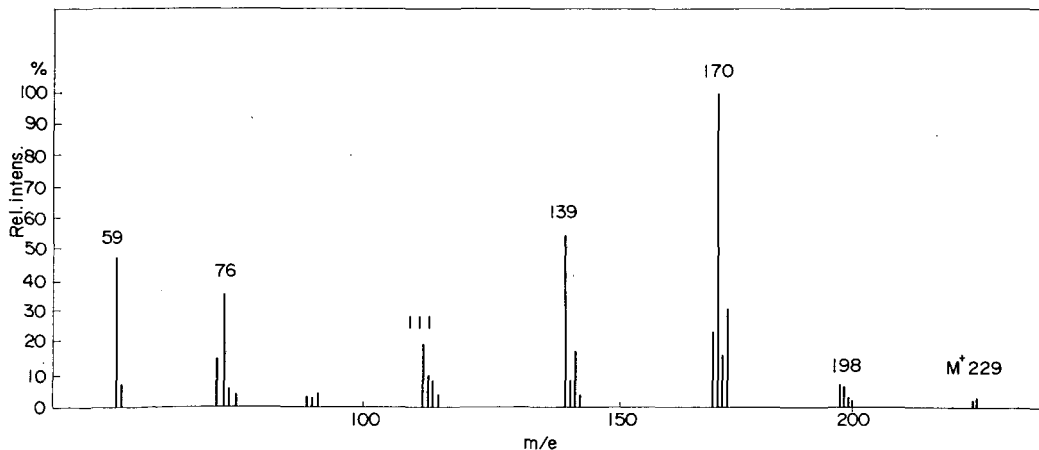


Fig. 21. MS Spectrum of Synthesized 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid dimethyl ester.

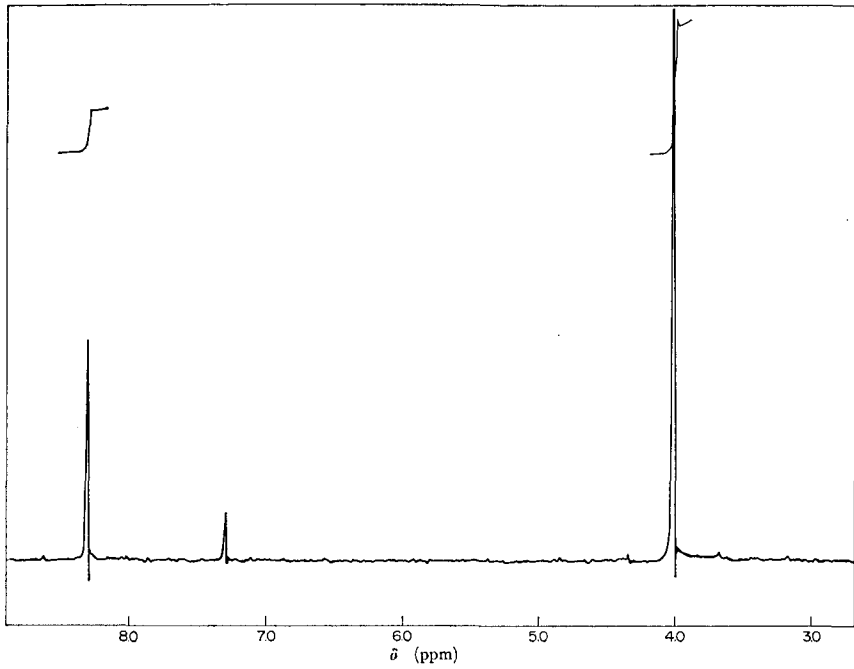


Fig. 22. NMR Spectrum of Synthesized 4-Chloropyridine-2, 6-dicarboxylic acid dimethyl ester (90 MHz, CDCl_3).

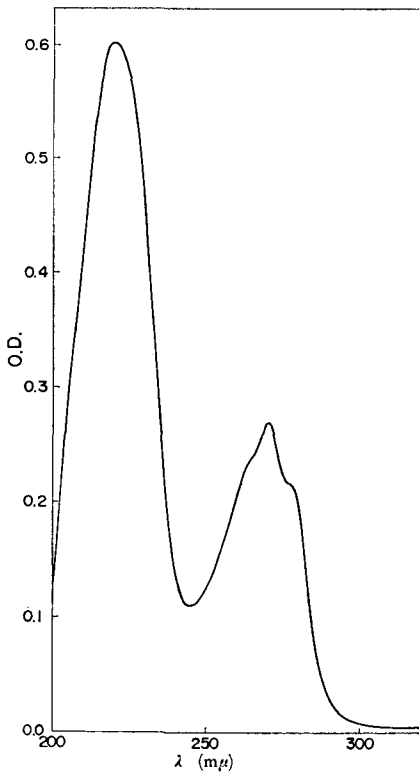


Fig. 23. UV Spectrum of Synthesized (2, 6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester (MeOH).

methyl ester (Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22), (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester (Fig. 23, Fig. 24, Fig. 25, Fig. 26)。

また合成の中間生成物をも含めた両合成物の融点，元素分析，UV，IR，MS，NMR に関する測定値は一括して作表してかかげてあるので，特に説明は加えない (Table 17)。

唯，中間合成物の Chelidonic acid ester に関して，BADGETT ら⁸¹⁾ はその構造を (A) のように考えている

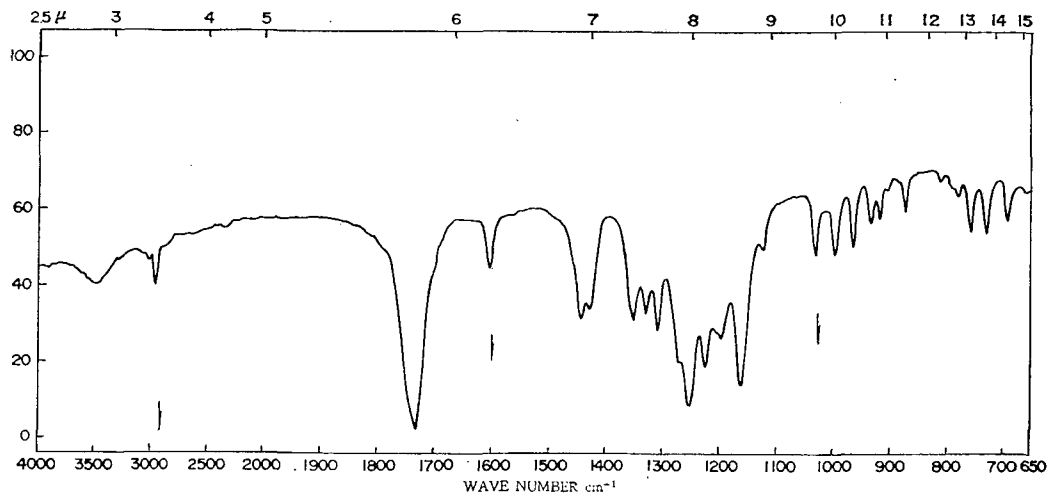
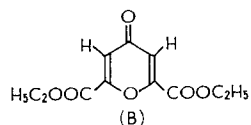
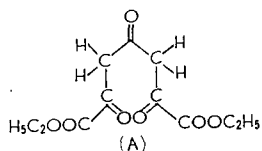


Fig. 24. IR Spectrum of Synthesized (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester.

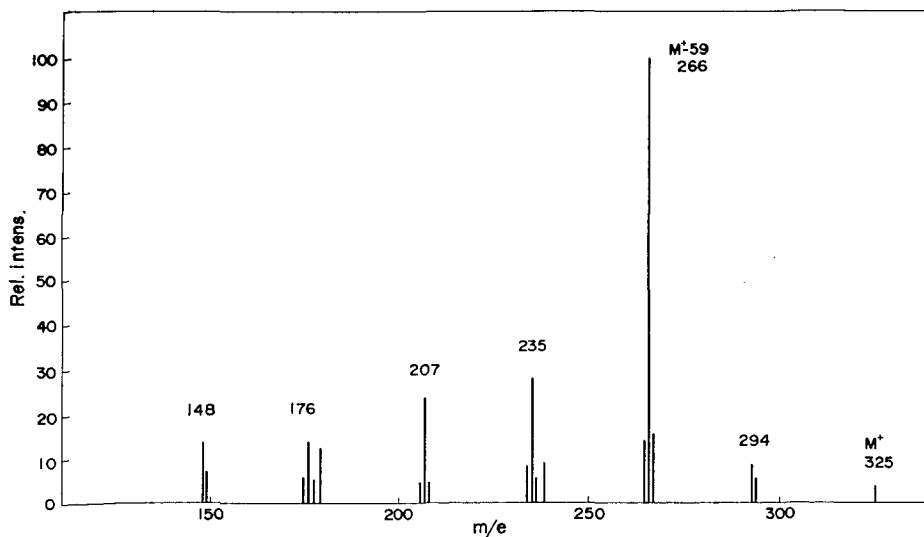
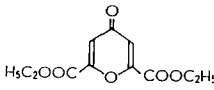
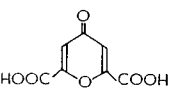
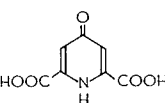
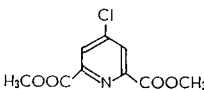
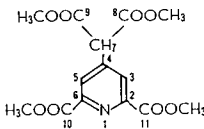


Fig. 25. MS Spectrum of Synthesized (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester.

Table 17. Properties of Intermediates and Last Product in Synthesis of 2, 6-Dicarboxy-4-pyridyl malonic acid tetramethyl ester

										
		$C_{11}H_{12}O_4$ Chelidonic acid ester White needle	$C_7H_4O_6$ Chelidonic acid Yellow powder	$C_7H_5O_5N \cdot H_2O$ Chelidamic acid Pale yellow powder	$C_{11}H_{12}O_4NCl$ 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid methyl ester White needle	$C_{14}H_{15}O_8N$ 2,6-Dicarboxy-4-pyridyl malonic acid tetramethyl ester Colorless needle				
M.p.		63°C	266°-270°C	262°C	142°C	118°C				
Anal.	Found.	C% 54.60 H% 5.17	C% 45.62 H% 2.19	C% 41.47 H% 3.55 N% 7.14	C% 46.82 H% 3.47 N% 6.17 Cl% 15.36	C% 51.43 H% 4.57 N% 4.38				
	Calcd.	C% 55.00 H% 5.04	C% 45.66 H% 2.19	C% 41.80 H% 3.51 N% 6.96	C% 47.07 H% 3.51 N% 6.10 Cl% 15.44	C% 51.69 H% 4.65 N% 4.31				
UV	λ_{max} ($m\mu$)	EtOH, 267, 276 (sh.)	H ₂ O, 271, 265	H ₂ O, 278, 207	MeOH, 280, 272, 265	MeOH, 270, 220, 263 (sh.), 275 (sh.)				
IR	ν_{max} (cm^{-1}) KBr	1750 (s)	1255 (bs)	3450 (bs)	1445 (w)	3610 (m)	3100 (m)	1110 (w)	2970 (w)	1225 (m)
		1662-3 (s)	1100 (s)	3100 (m)	1415 (s)	3450 (s)	1722 (s)	990 (m)	1735 (s)	1200 (w)
		1630 (w)	1020 (s)	3050 (s)	1255 (s)	2500 (bs)	1573 (m)	970 (m)	1605 (m)	1162 (s)
		1605 (w)	950 (m)	2825 (bm)	1240 (s)	1700 (bm)	1440 (s)	910 (m)	1445 (s)	
		1410 (w)	915 (m)	2550 (w)	1200 sh. (m)	1610 (s)	1333 (s)	890 (m)	1430 (s)	
		1375 (m)	885 (s)	2450 (w)	1130 (s)	1390 (bs)	1267 (m)	840 (m)	1350 (m)	
1350 (m)	860 (m)	1720 (s)	960 (s)	1330 (bm)	1250 (s)	780 (m)	1330 (m)			
1280 (bs)	775 (m)	1640 (s)	915 (s)	1250 (bm)	1200 (s)	760 (m)	1310 (m)			
		1572-3 (s)	790, 740, 685	1125 (bm)	1150 (s)	740 (w)	1253 (s)			
MS	m/e	240 (M ⁺)	184 (M ⁺)	183 (M ⁺)	229 (M ⁺)	325 (M ⁺)				
		211 (M ⁺ -29)	167 (M ⁺ -OH)	139	198 (M ⁺ -31)	294 (M ⁺ -31)				
		195 (M ⁺ -45)	156	121	170 (M ⁺ -59, base peak)	266 (M ⁺ -59)				
		183	139	95	139 (170-31)	235				
		167	128	93	111	207				
		156	69 (base peak)		76	176				
140			59	148						
NMR	δ (ppm) 90 MHz (TMS)	1.4/t (6H, 2×CH ₃ -CH ₂ OOC-)	6.96/s (2H, Vinyl)	6.7/b (1H, NH)	4.05/s (6H, CH ₃)	3.80/s (6H, CH ₃ at C 8, 9)				
		4.45/q (4H, 2×CH ₂)	10.0/b (2H, OH)	7.6/s (2H, Vinyl)	8.3/s (2H, Vinyl)	4.01/s (6H, CH ₃ at C 10, 11)				
		7.15/s (2H, Vinyl)				4.81/s (1H, H at C-7)				
		CDCl ₃	(CD ₃) ₂ SO	(CD ₃) ₂ SO	CDCl ₃	8.39/s (2H, Pyridine ring)				

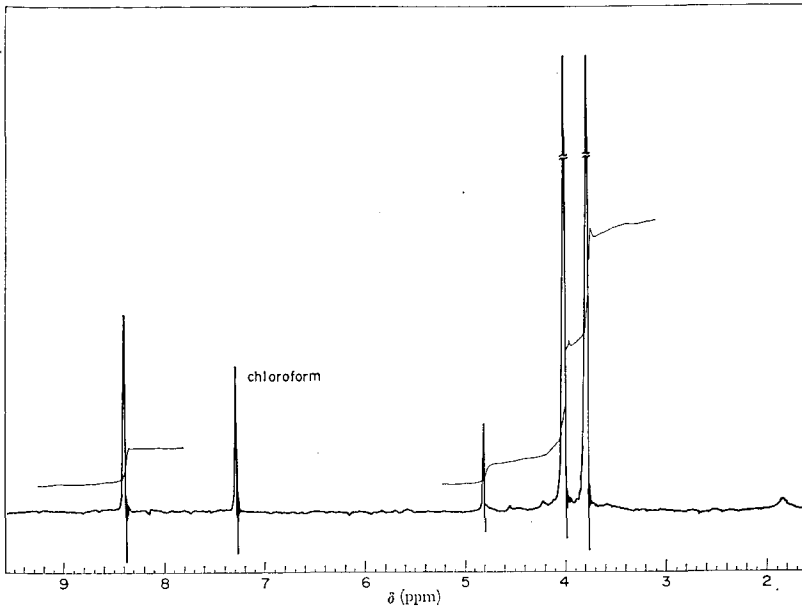


Fig. 26. NMR Spectrum of Synthesized (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester (90 MHz, CDCl_3).

が、今回合成したこの化合物の MS では M^+ の m/e 240 が検出されたこと、また NMR でメチレンの存在は否定され、ビニルプロトンの存在が示されたことなどにより (B) の構造が支持された。

また 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid dimethyl ester と (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester の MS に見られるフラグメンテーションを観察してフラグメントの主な開裂経路を推定すると図のようである (Fig. 27)。

以上にあげた各データにより両化合物は目的どおり合成されたことを確かめた。

第4節 色素の糖部の構造決定

4-1 色素の酸加水分解

Salicornia pigment の糖部を検索するため色素を酸加水分解し、加水分解生成物を PC および PE 分析した。

<実験>

酸加水分解の方法：

Salicornia pigment 結晶 (10 mg) を 22% HCl (4 ml) に溶解し、 100°C で 1 時間加熱加水分解し、反応混液を減圧濃縮し、塩酸を除去後、濃縮液をポリアミドカラム ($\phi 2 \times 5$ cm) に通し、水溶出液を濃縮し、糖検出用試料とした。

PC： 溶媒，ブタノール-酢酸-水 (4:1:2, v/v), 上昇法 発色剤，アニリンフタル酸

PE： 電解質，Phosphate buffer (pH 6.8, $\mu=0.1$) 泳動条件，400 V, 16 V/cm, 1 時間

PC-PE 2次元クロマトグラフィー： 一次 PC, 二次 PE 展開

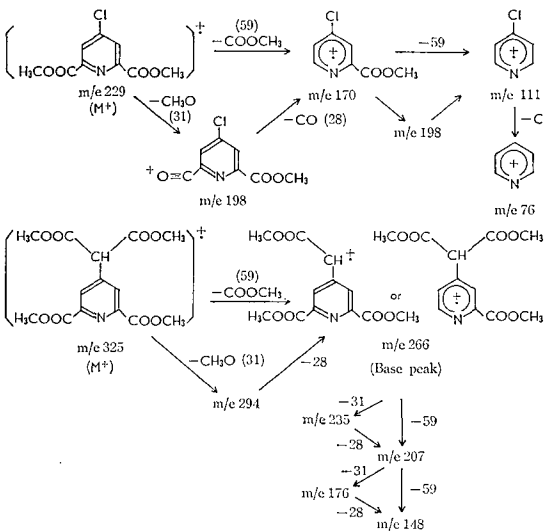


Fig. 27. Estimated Fragmentation-pathway of 4-Chloropyridine-2,6-dicarboxylic acid dimethylester and (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester.

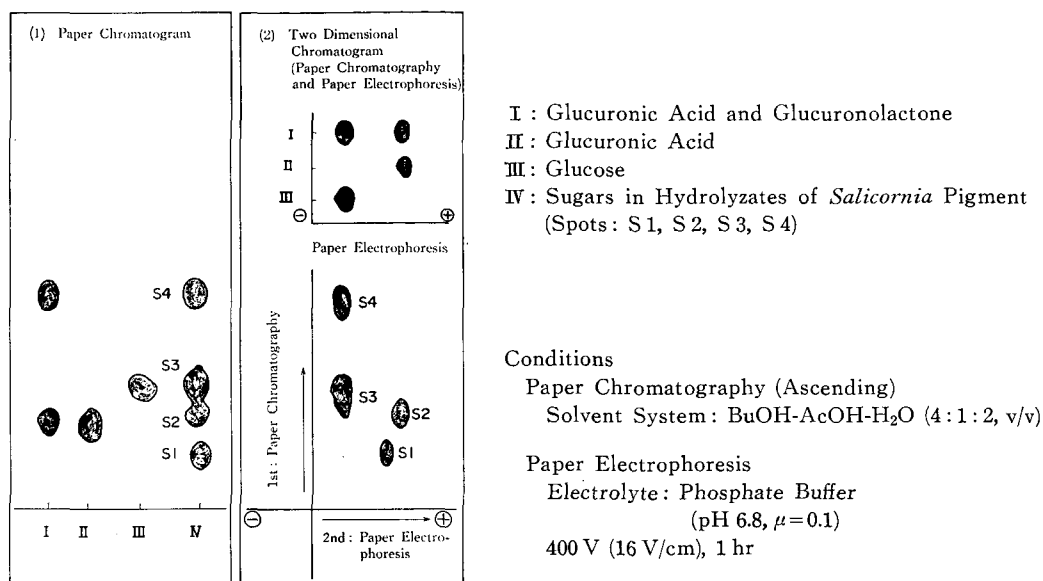


Fig. 28. Paper Chromatography and Paper Electrophoresis of Hydrolyzates of *Salicornia* Pigment.

<実験結果と検討>

色素の酸加水分解によって得た糖検出用試料を PC, PE の分析結果 (Fig. 28), PC でアニリンフタル酸で発色する 4 スポット S1~S4 が検出された。このうち PC で明瞭に分離しなかった S2, S3 は PC-PE を併用する二次元分析 (Fig. 28 の右図) の結果, 分離でき, 純品との比較により S2 はグルクロン酸, S3 はグルコースに一致し, S4 はグルクロン酸が加熱により生成したグルクロノラクトンと同定された。

また Rf 値の低い S1 はスポットを水溶出して酸加水分解して PC で調べたところ単糖としてグルコースとグルクロン酸およびそのラクトンが検出されたことから, グルコースとグルクロン酸が結合した二糖類であると推定された。

4-2 糖の単離と構造解析

Salicornia pigment の酸部分加水分解生成糖の検索によって二糖類と推定される糖が検出されたので, この構造を明らかにするため, *Salicornia* pigment を過酸化水素で分解し, 二糖部分を単離, 精製し, 酸および酵素分解, 過ヨウ素酸酸化, メチル化-メタノリシス生成物のガスクロマトグラフィー (GLC), アセチル化物の NMR, MS による解析を行ない, その構造を決定した。

<実験>

(1) 糖の単離:

Salicornia pigment 結晶 (1.8 g) を 28% 過酸化水素

溶液 (50 ml) に溶解, 室温に 24 時間静置後, Pd-C (10 mg) を添加, 過剰の H₂O₂ を除去した後, 濾過し, 濾液を活性炭-セラライトカラム ($\phi 3 \times 10$ cm) に吸着, 水 (2 l) で洗浄後, 10% エタノールで溶出, 溶出液を 30°C で減圧濃縮し, 30 枚の濾紙を使って PC [溶媒系, BuOH-AcOH-H₂O (4:1:2, v/v); 濾紙, 東洋濾紙 No. 50] を行ない, 二糖に相当する部分を切りとって水で溶出, イオン交換樹脂 [Amberlite IR-120 (H+型): Amberlite IR 45 (OH-型), 1:1, w/w] で処理し, 濾液を減圧濃縮し, 凍結乾燥して白色粉末 (19 mg) を得た。以下これを“単離糖”と略記する。

(2) 塩酸加水分解:

“単離糖” (5 mg) を 22% HCl (20 ml) に溶解, 100°C で 5 分間加熱加水分解後, 濃縮乾固し, PC (溶媒系, 前と同じ, 発色試薬, アニリンフタル酸) で分解物の検索を行なった。

(3) 酵素分解:

“単離糖” (3 mg) を 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.1 ml) に溶解, 酵素 [市販の β -D-Glucosidase, あるいは β -D-Glucuronidase (5 mg)/酢酸緩衝液 (10 ml)] 溶液 (1 ml) を添加し, 37°C で 1 時間インキュベートし, PC (溶媒系, 発色試薬, 前と同じ) で分解物を調べた。

(4) 過ヨウ素酸酸化:

AVIGAD²⁾ が報告した微量定量法を次のように簡便法に改良し測定した。

試薬：

(A) Ferrous-2,4,6-tri-2-pyridyl-s-triazine 溶液： 2,4,6-tri-2-pyridyl-s-triazine (75 mg) を酢酸 (46 ml) と 1M 酢酸ナトリウム (210 ml) に溶解し、新たに調製した 0.0314% モール塩 ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O) 水溶液 (100 ml) を添加、水で 1 l にし、褐色ビンに入れ保存したもの。

(B) 20 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム貯蔵液： メタ過ヨウ素酸ナトリウム (855.6 mg) を 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) で全量を 200 ml にしたもの。

(C) 2 mM 糖溶液： 乾燥した糖を正確に秤量し、40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.2) で全量を 25 ml にする。

定量方法：

2 mM 糖溶液 (10 ml) (C) と 20 mM NaIO₄ 溶液 (B) を褐色ビンに入れ、冷暗所 (4°C) あるいは暗所 (室温 15~20°C) で反応させた。一定時間毎、反応液から 1 ml をとり、50 ml に水で希釈し、その 0.5 ml を (A) 液 4.5 ml に加え、よく攪拌後、593 mμ で吸光度 (O. D.) を測定し、標準曲線から残存 NaIO₄ 量を定量した。

(5) メチル化：

メチル化は箱守法¹⁶⁾によって行なった。“単離糖”(150 mg) を窒素気流中、ジメチルスルフォキシド (2 ml) に溶解しておき、前もってヘキサンで 4 回洗浄した NaH 500 mg をジメチルスルフォキシド (2 ml) に添加し、窒素気流中、60°C、1 時間攪拌し生成した Methyl sulfinyl carbanion 溶液を、上記の糖溶液に添加、30 分間攪拌後、CH₃I (1 ml) をゆっくり滴下した。さらに 3 時間窒素気流中で攪拌して後、水 10 ml を添加し、その混合液を活性炭-セライトカラム (φ 2×13 cm) に吸着させ、水 (2 l) で洗浄後、10% エタノールで溶出し、その溶出液を濃縮乾固後、シリカゲルカラム (φ 3.5×16 cm) に吸着、エーテル-トルエン (2:1, v/v) で溶出、メチル化糖のフラクションを濃縮乾固しシラップ状物質 (約 20 mg) を得た。

(6) メタノリシス：

この (5) で得たメチル化糖を 1N HCl-メタノールに溶解、封管中、24 時間 80°C で加熱し、メタノリシスを行ない、減圧下で溶媒を除去しシラップ状のメタノリシス生成物 (約 10 mg) を得た。

(7) 水素化リチウムアルミニウム還元

(5) で得たメチル化糖 (約 10 mg) をエーテル (10 ml) に溶解し、1.35% 水素化リチウムアルミニウムのエーテル溶液 (20 ml) を滴下し、18 時間攪拌、反応後水を添加し、濾過、クロロホルムで洗浄、濾液と洗液を合し、濃

縮乾固し、前と同様にメチル化、メタノリシスを行ないシラップ状のメタノリシス生成物 (約 5 mg) を得た。

(8) アセチル化：

“単離糖”(10 mg) を Sodium methoxide (2 mg) 含有メタノール (10 ml) に溶解、室温で 1 時間静置後、冷 4% 過塩素酸含有無水酢酸 (1 ml) を滴下し、重炭酸水素ナトリウムで中和、クロロホルムで抽出、溶媒を除去し、アセチル化物 (19 mg) を得た。

(9) 分析法：

ガスクロマトグラフィー (以下 GLC と略記)：

装置；063 形日立ガスクロマトグラフ

カラム担体と固定相；Celite 545, Butane-1,4-diol succinate (0.3×150 cm)

カラム温度；175°C

流速；60 ml (N₂)/min.

PC：溶媒系, BuOH-AcOH-H₂O (4:1:2, v/v)

MS：既述の方法に同じ。

<実験結果と考察>

(1) 塩酸加水分解

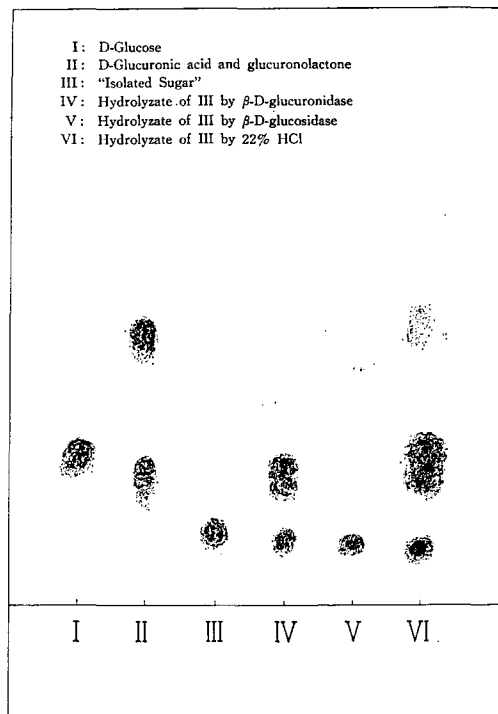


Fig. 29. Paper Chromatogram of Enzymic or Hydrochloric acid Hydrolyzates of "Isolated Sugar".

Table 18. Periodate Oxidation of "Isolated Sugar"

Reaction temp. (°C)	Consumption of Periodate moles/Sugar 1 mole			
	4°C		Room temp.	
Reaction period (h)	23	25	18	20
"Isolated Sugar"	5.2	5.2	5.9	6.0
D-Kojibiose	4.8	5.0	—	—
D-Maltose	4.7	5.0	5.05	5.1
D-Glucose*	5.0	5.0	5.0	5.0

* In the case of D-glucose, a constant consumption value was obtained after reaction for 4~5 hours.

“単離糖”の構成成分を調べるため、塩酸加水分解を行なった結果 (Fig. 29), 図前述と同様、D-Glucose と D-Glucuronic acid およびその Lactone が検出された。

(2) 酵素分解

次にこれらの構成糖の結合順序を決めるため、“単離糖”の酵素分解を行なった結果 (Fig. 29), β -D-Glucuronidase を作用させると D-Glucose と D-Glucuronic acid に分解し、両者のモル比は PC 上のスポットの大きさを純品と比較しながら肉眼で観察した結果、ほぼ 1:1 であった。しかし、 β -D-Glucosidase を作用させても分解が起きないことが示された。

以上の酸加水分解と酵素分解の結果から、色素の糖部は β -D-Glucosyl-D-glucuronic acid ではなく β -D-Glucuronyl-D-glucose, 即ち一種の Aldobiouronic acid と推定された。

(3) 過ヨウ素酸酸化

次にこの糖の結合位置を明らかにするため、過ヨウ素酸酸化微量定量改良簡便法により、過ヨウ素酸の消費量を測定した結果 (Table 18), 4°C では糖 1 mole 当り過ヨウ素酸約 5 mole 消費し、室温では約 6 mole 消費した。これは Fig. 30 に示したように、ウロナイドに見られる Overoxidation のためと考えられ、この実験からだけでは結合位置を決めることはできなかった。

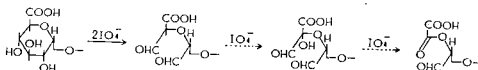


Fig. 30. Overoxidation of Non-reducing End Group of Uronide¹²⁾.

(4) メチル化後のメタノリシス

メチル化後、メタノリシスを行なって得た生成物を

GLC にかけて、純品の GLC との比較の結果 Methyl (methyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucopyranosyl)uronate と Methyl (3,4,6-tri-O-methyl)-D-glucopyranoside のピークが、それぞれ保持時間 8 分と 12 分のところに検出された (Fig. 31 A)。

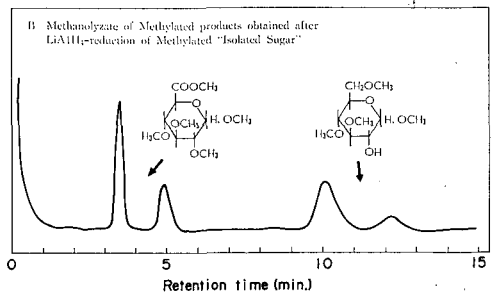
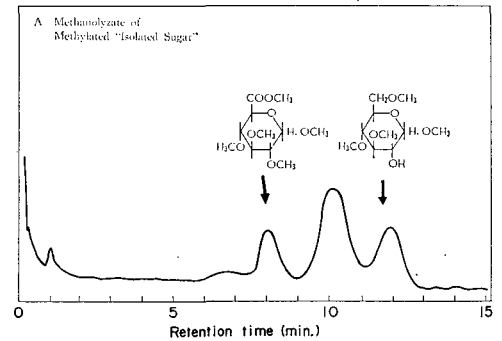


Fig. 31. Gas Liquid Chromatograms of Methylated Sugar Derived from "Isolated Sugar".

(5) 水素化リチウム・アルミニウム還元

上述の GLC では両化合物のそれぞれのアノマーのピークが重なって保持時間約 10 分のところに現われるた

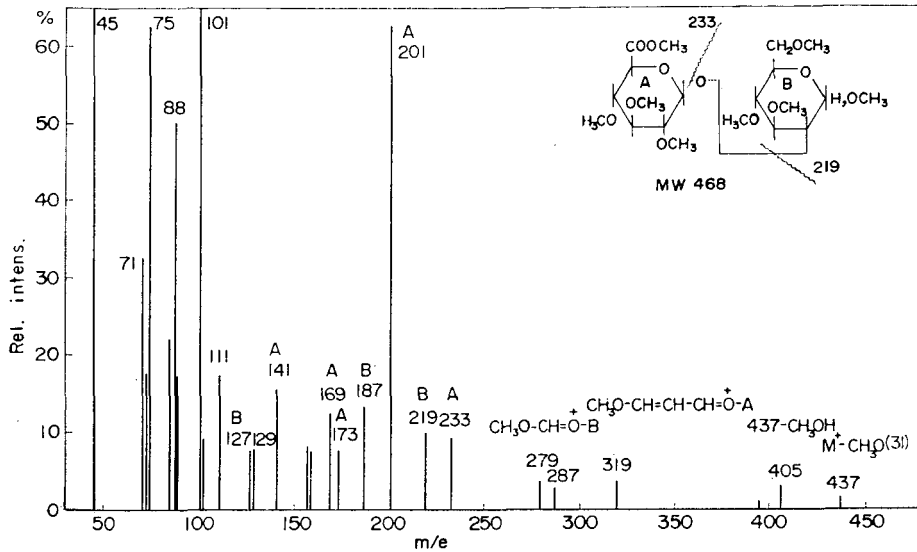


Fig. 32. MS Spectrum of Methylated Derivative of "Isolated Sugar".

め、次に<実験>の部(5)で得たメチル化二糖を LiAlH_4 で還元後、メチル化、さらにメタノリシスして得た生成物を GLC 分析し、純品のそれと比較の結果 (Fig. 31 B), 明瞭に分離され、Methyl (2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl)-D-glucopyranoside の二つのアノマーはそれぞれ 3.5 分、5 分の保持時間のところに、Methyl (3, 4, 6-tri-O-methyl)-D-glucopyranoside の二つのアノマーは 10 分と 12.2 分のピークとして検出された。

以上のメチル化糖の GLC 分析によって、“単離糖”は D-Glucose の C-2 位と D-Glucuronic acid の C-1 位とが結合していることが明らかにされた。

(6) “単離糖”のメチル化物の MS 解析

<実験>の部(5)で調製した“単離糖”のメチル化物の MS 測定結果 (Fig. 32), KOCHETKOV²³⁾ や KVÁČIK ら²⁶⁾ の研究を参考にして検討した。

KVÁČIK ら²⁶⁾ はメチル化した Aldobiouronic acid の MS で m/e 319, m/e 287 は 1→2 結合, 1→4 結合の Aldobiouronic acid にのみ生成されると報告しているが、この両フラグメントは、今回の“単離糖”にも検出された。しかし先にのべたメチル化糖の GLC の結果から 1→2 結合であることが明らかにされているので 1→4 結合しているのではないことがわかる。

主なフラグメントの開裂経路を Fig. 33 のように推定したが、m/e 437 (M^+-31) のピークは Glucose の C-1 の CH_3O 基が脱離したフラグメント、m/e 219 は Glucose に由来するフラグメント、m/e 233 は Glucuronic acid

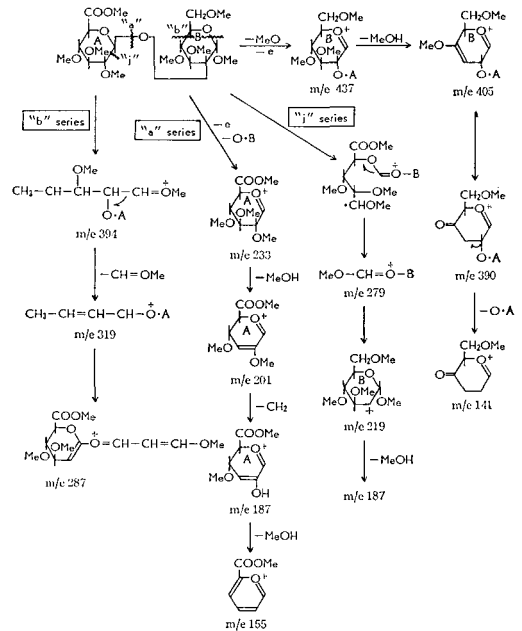


Fig. 33. Estimated Fragmentation-Pathway of Methylated "Isolated Sugar".

に由来するフラグメント、などと合理的に図中の構造を裏付ける帰属をなし得た。

(7) “単離糖”のアセチル化物の解析

<実験>の部(5)で調製した“単離糖”アセチル化物

を次の糖部関連化合物の合成で得た Sophorobiouronic acid のアセチル誘導体と比較対照しつつ解析を行なった。

この比較解析で断っておかなくてはならないことは、合成 Sophorobiouronic acid のアセチル誘導体では構

成 Glucose の C-1 位の OH は OCH₃ になっているのに対し、“単離糖”-アセチル化物では、もしそれが Sophorobiouronic acid であるとするれば、アセチル化の方法から考えて C-1 位の OH は OCO・CH₃ となっているはずである。

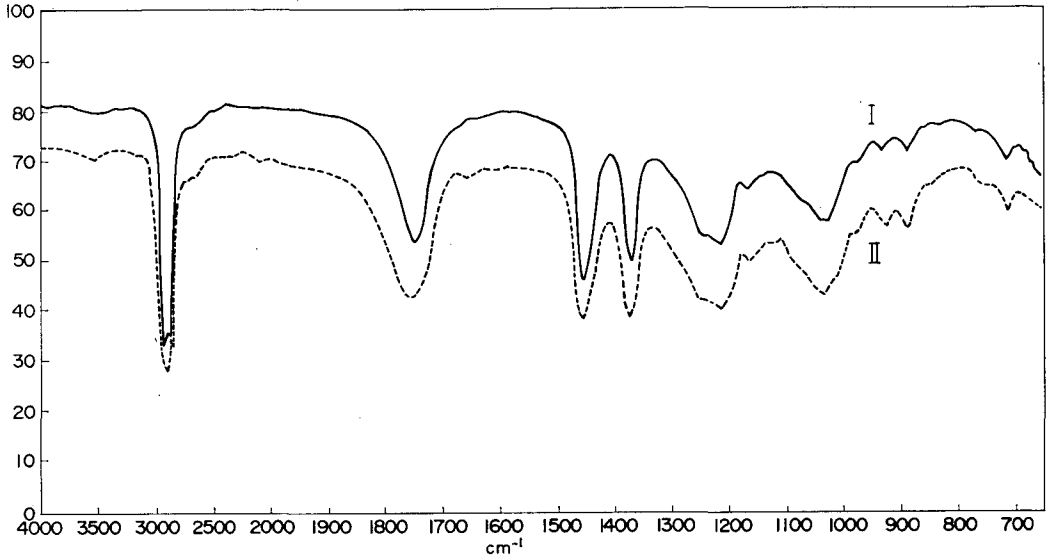


Fig. 34. IR Spectra of Acetylated Derivatives (Nujol).

I "Isolated Sugar".
II Synthesized Sophorobiouronic acid

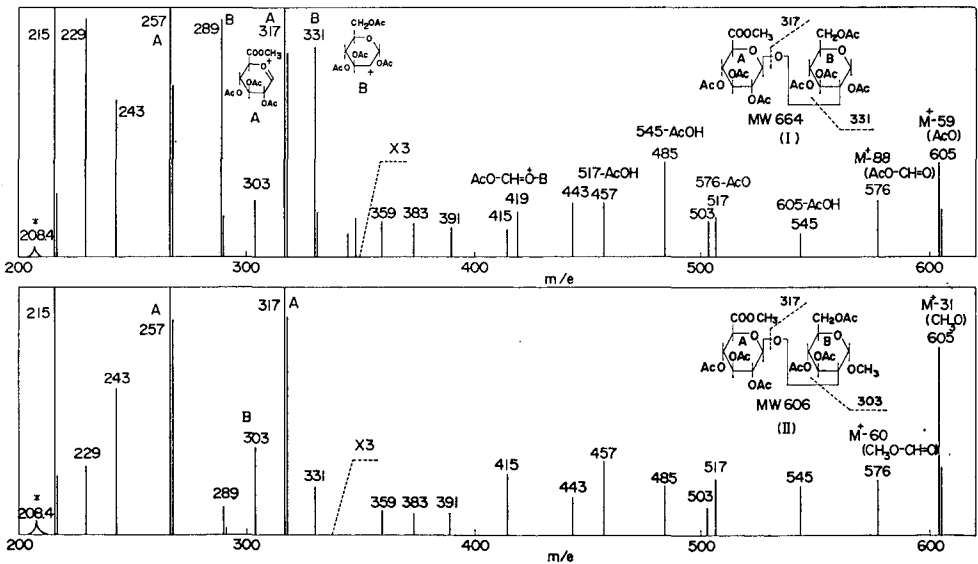


Fig. 35. MS Spectra of Acetylated Derivatives.

(I) "Isolated Sugar"
(II) Synthesized Sophorobiouronic acid

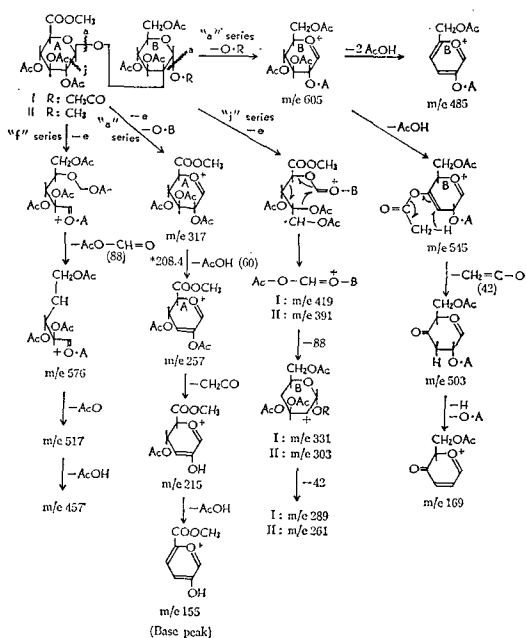


Fig. 36. Fragmentation of Acetylated Sophorobiouronic acid.

IR (Fig. 34) では両アセチル化物は非常によく似た吸収を示した。

MS (Fig. 35) でも親ピークは検出されず、C-1位の OCH_3 と $\text{OCO}\cdot\text{CH}_3$ によるちがいは別として、主なフラグメントの開裂様式 (Fig. 36) に示したように C-1 のアセチル基、あるいはメトキシ基の脱離による m/e 605 ($M^+ - 59$, あるいは $M^+ - 31$) が検出され、他のフラグメントでも両アセチル化物はよく一致した。

NMR (Fig. 37) で両者は C-1 のアセチルプロトンとメチルプロトンの違い以外、スペクトルパターンに類似性が見られた。 δ 3.7 ppm から 5.6 ppm の間のメチン、メチレンプロトンの帰属が困難であったが、糖部関連化合物の合成の項で述べるようにシフト試薬 Eu (DPM)₃ を使った合成 Sophorobiouronic acid のアセチル化物の NMR 解析の結果を採用して、かなりの程度帰属が可能となった。この解析検討の詳細と結果は次項にあげてある。

(8) 以上の実験結果の検討から *Salicornia* pigment の糖部の構成二糖の構造は D-Glucuronic acid と D-Glucose が β 1 \rightarrow 2 結合した一種の Aldobiouronic acid であるところの Sophorobiouronic acid, すなわち

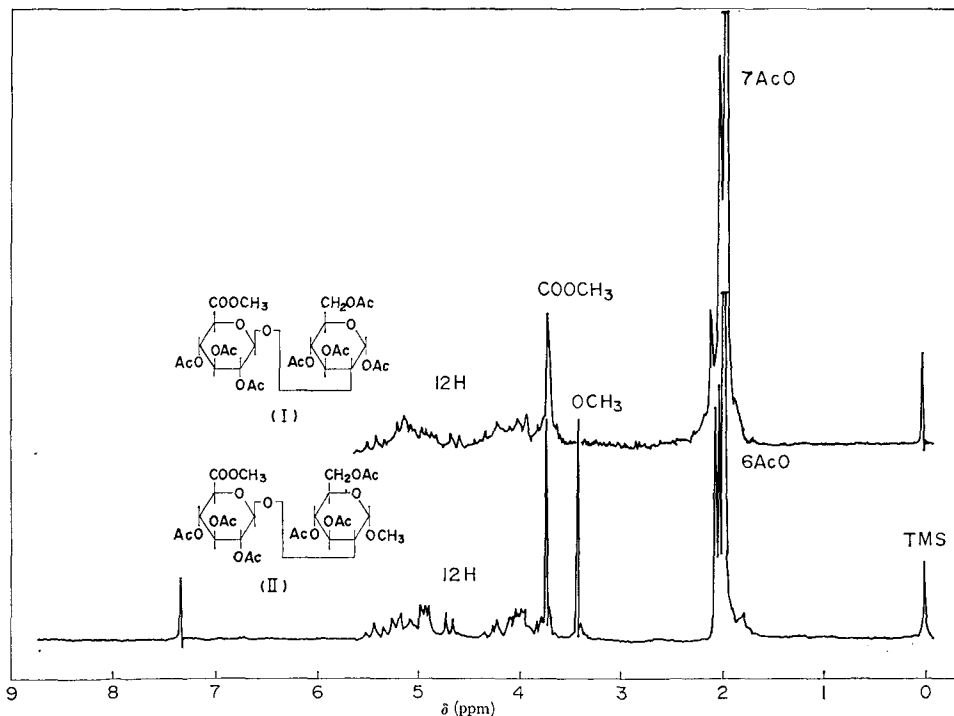
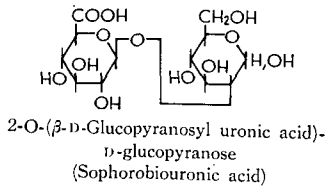


Fig. 37. NMR Spectra of Acetylated Derivatives.

(I) "Isolated Sugar" (II) Synthesized Sophorobiouronic acid (100 MHz, CDCl_3)



2-O-(β-D-Glucopyranosyl uronic acid)-D-glucopyranose と決定した。

4-3 糖部関連化合物の合成

前節の実験で *Salicornia* pigment の糖部の構造を Sophorobiouronic acid [2-O-(β-D-Glucopyranosyl uronic acid)-D-glucopyranose] と決定する際、「単離糖」をアセチル化物に変換して解析を行なったが、その場合 Sophorobiouronic acid のアセチル化物が比較物質として必要であったことと、現在までに Sophorobiouronic acid の合成は報告がないことから、この二糖類の有機合成を試み、その物理・化学的性質を調べた。

Sophorobiouronic acid に類似構造の Sophorose [2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-D-glucopyranose] は既に COXON ら¹⁰⁾ が Methyl-4, 6-O-benzylidene-α-D-gluco-

pyranoside と 2, 3, 4, 6-Tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl bromide を縮合させ、合成している。

そこで、彼らの方法などを参考にし合成系統図 (Fig. 38) に従い化合物 (2) と化合物 (4) を KOENIGS-KNORR 縮合させることを主体とする合成法によりアセチル誘導体 (6) とし、最後に脱アセチル化して Sophorobiouronic acid (7) を合成することを試みた。

又、従来オリゴ糖の構造解析はメチル化-メタノリシス、過ヨウ素酸酸化などによって行なわれてきたが、試料量、収率、測定値のふれなどの点で必ずしも満足すべきものでなかった。

今回、*Salicornia* pigment の糖部の同定に際し、そのアセチル化物および合成アセチル化糖の構造解析に MS による方法が少量の試料でも効果的な解析が可能であることを示したが、ここでは合成アセチル化糖について、NMR による解析、とくに最近、シフト試薬の使用により、複雑な NMR パターンを単純化し、解析を容易化できることが知られているので、シフト試薬 Eu(DPM)₃ を用いる NMR 解析を試みた。

<実験>

[1] Methyl-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyluronate (1) の合成:

BOLLENBACK ら⁷⁾ の方法によって D-Glucuronolactone を NaOCH₃ 含有メタノール溶液中で反応後、アセチル化し合成した。

D-Glucuronolactone (12.2 g) を NaOCH₃ (0.1 g) 含有無水メタノール (70.4 ml) に添加、室温で 1.5 時間攪拌、溶解後溶媒を除去。無水酢酸 (47 ml) に溶解し、その溶液に過塩素酸 (0.2 ml) 含有無水酢酸 (7 ml) を滴下 (40°C 以上にならぬように氷冷)、一夜静置後、更に過塩素酸 (0.1 ml) 滴下、一夜 4°C に静置後生成した結晶を濾過、エーテルで洗浄し、風乾物を熱エタノールから再結、長針状結晶 ((1)-1, β-anomer) (6.315 g) を得た。

濾液を碎水 (250 g) 中に注加、重曹で中和、濾過、濾液をクロロホルムで抽出、無水 Na₂SO₄ で脱水後、溶媒を除去、得られたシラップを温イソプロパノールに溶解し、一夜静置、生成した結晶を濾過、エーテルで洗浄し風乾物を熱エタノールから再結、長針状結晶 ((1)-2, α-anomer) (4.098 g) を得た。

[2] Methyl (tri-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl-bromide)-uronate (2) の合成:

BOLLENBACK⁷⁾ および BOWERING ら⁹⁾ の方法によって ((1)-2) を臭化水素含有氷酢酸中でブロム化し合成した。

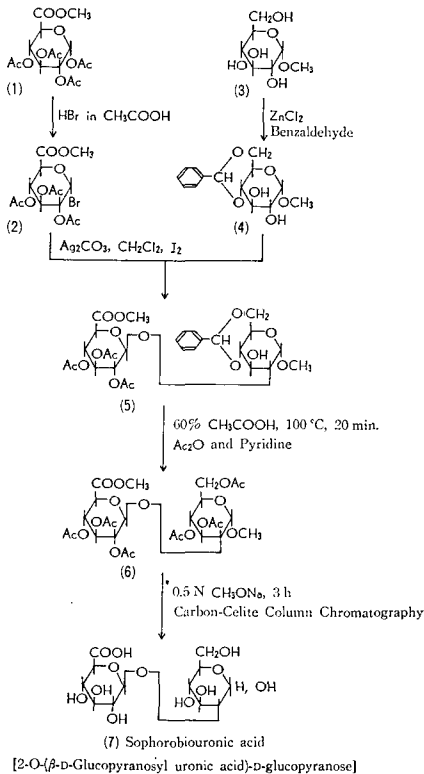


Fig. 38. Synthesis of Sophorobiouronic acid.

((1)-2) (5 g) を臭化水素飽和氷酢酸 (31 ml) に溶解, 直ちに減圧濃縮し, 赤褐色シラップをクロロホルム (30 ml) に溶解, 冷重曹飽和水溶液, 冷水で洗浄後, 無水 Na_2SO_4 で乾燥, 濾過, 溶媒を除去, 得られたシラップ (赤褐色) をエタノールに溶解, 低温に静置, 生成した結晶を濾過, 熱エタノールから再結, (2) [収量 4.66 g, (88.4%)] を得た。

[3] Methyl-4, 6-O-benzylidene- α -D-glucopyranoside (4) の合成:

Dowex 50 (H^+) を触媒にし合成した⁶⁾ Methyl- α -D-glucopyranoside (3) (30 g) に RITCHTMEYER⁶¹⁾ の方法により ZnCl_2 (22.5 g) と Benzaldehyde (75 ml) を添加, 48 時間振盪後, 冷水 (750 ml) 中にゆっくり注加, 氷室に一夜静置し, 生成した白色結晶を濾過, 冷水 (50 ml), ケロシン (50 ml) で 3 回洗浄, 風乾後 70°C で減圧乾燥, 熱水から再結し (4) [収量 16.07 g (36.8%)] を得た。

[4] Methyl-4, 6-O-benzylidene-2-O-[methyl-(2, 3, 4-tri-O-acetyl)- β -D-glucuronyl]- α -D-glucopyranoside (5) の合成:

COXON ら¹⁰⁾ の Sophorose 合成方法を応用して, (2) と (4) を縮合させ (5) を合成した。

(4) (1.2 g) と炭酸銀 (1.2 g), Drierite (3.2 g), Dichloromethane (15 ml) を混合, CaCl_2 管をつけ 30 分間攪拌後, (2) (2.25 g) と Iodine (322 mg) を添加, 室温下 19 時間攪拌, 濾過, 残渣を Dichloromethane で洗浄, 濾液を減圧濃縮 (35°C), 得られた黄色シラップを熱 2-Ethoxy ethanol に溶解, 低温室に静置, 生成した結晶を濾過, 冷 2-Ethoxy ethanol, エタノールで洗浄, 熱エタノールから再結, 針状結晶 (5) [収量, 635 mg (24.9%)] を得た。

[5] Methyl-3, 4, 6-tri-O-acetyl-2-O-[methyl-(2, 3, 4-tri-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl]- α -D-glucopyranoside (6) の合成:

(5) (103 mg) を 60% 酢酸 (15 ml) に溶解し, 100°C; 20 分間加熱後, 水, トルエンを加え, 数回蒸発乾固をくりかえした。シラップ状残渣にピリジン (2 ml) と無水酢酸 (2 ml) を添加, 室温で一夜静置後, 氷水に注加し, クロロホルムで抽出, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, 濾過し, 濃縮乾固し, エタノールから再結しアセチル化物 (6) (97 mg) を得た。

[6] 2-O-(β -D-Glucopyranosyl uronic acid)-D-glucopyranose (Sophorobiouronic acid) (7) の合成:

(6) (50 mg) を温メタノールに溶解し, 1 N NaOCH_3 メタノール溶液 (0.8 ml) を添加, 4 時間室温で静置。メタノールで稀釈し, Amberlite IR 120 (H^+) カラム (ϕ 2.5 × 5 cm) と Amberlite IR 45 (OH^-) カラム (ϕ 2.5 × 6 cm) に通し, 溶出液を減圧濃縮し, 濾紙 50 枚でマスペーパークロマトグラフィー (展開溶媒 $\text{BuOH-AcOH-H}_2\text{O}=4:1:2$, v/v) を行なった。

二糖部分を切りとり温水で抽出し, イオン交換樹脂で処理し, 濃縮, 凍結乾燥して (7) (7 mg) を得た。

[7] 測定法

旋光度: 常法により測定した。

融点, 元素分析, IR: 前述の方法により分析測定した。

NMR: 常法, およびシフト試薬 Eu (DPM)₃ 添加法, Proton spin decoupling 法を採用した。

<実験結果と考察>

合成最終産物 Sophorobiouronic acid は微量にしか得られず, 詳細な実験はできなかったが, 色素配糖体の二糖部分と PC, PE, IR は一致し, 目的物が合成されたものと推定された。

そこで, 更にこのアセチル化物の NMR からその構造を検討した。

先に, あっけしりから「単離糖」のアセチル化物の NMR 検討で δ 3.7~5.6 ppm 域におけるメチン, メチレンプロトンの帰属が困難であったことを述べたが, 合成アセチル化糖にシフト試薬 Eu (DPM)₃ を添加し測定した結果 (Fig. 39), δ 3.7 ppm から 5.6 ppm の間のメチン, メチレンプロトンはこの添加によって低磁場シフトし, 4.3 ppm から 6.8 ppm の範囲に現われた。

次にこのメチン, メチレンプロトンの帰属を行なうため, Proton spin decoupling の実験を行なった結果 (Fig. 40), δ 5.3 ppm ($J=4$ Hz) の C-1 のアノメリックプロトンの位置を照射すると, 高磁場にある 4.3 ppm の double doublet ($J=4, 9.5$ Hz) は doublet ($J=9.5$ Hz) に変化し, 逆にその部分を照射すると 5.3 ppm の doublet ($J=4$ Hz) は singlet に, 6.3 ppm に他のシグナルと重なっている triplet ($J=9.5$ Hz) は doublet ($J=9.5$ Hz) に変化した。この結果, 5.3 ppm のシグナルは C-1 のプロトンに, 4.3 ppm の double doublet は C-2 のプロトンに帰属され, 1→2 結合のため他のメチンプロトン (アセチル基のつけ根) より高磁場にシフトしていた。さらにこれとカップルしている 6.3 ppm の triplet は C-3 のプロトンに帰属された。他のプロトンについては, 全部は帰属できなかったが, 他の単糖, オリゴ糖のスペクトルと比較しながら, 図, 表中に記入したように帰属した

(Fig. 40, Table 19)。この帰属の結果は“単離糖”の NMR 解析に応用した。

参考まで他のアセチル化オリゴ糖に Eu (DPM)₃ を添加し測定した NMR を Fig. 41~44 に載せた。

Table 19. Properties of Intermediates in Synthesis of Sophorobiouronic acid [2-O-(β -D-Glucopyranosyl uronic acid)- β -D-glucopyranose]

		(1)-2	(2)	(4)	(5)	(6)
M.p. (°C)		110	104	162	212	
[α] _D ²⁰		+90.5 (C=1, CHCl ₃)	+193 (C=1, CHCl ₃)	+103 (C=2, CHCl ₃)	+34 (C=1, CHCl ₃)	
Anal.	Found.	—	—	—	C% 53.81 H% 5.85	C% 48.86 H% 5.73
	Calcd. for				54.18 5.68 (C ₂₇ H ₃₄ O ₁₅)	49.06 5.66 (C ₂₆ H ₃₆ O ₁₈)
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹)	1755 (vs)	1740-1760 (vs)	3400 (s)	3498 (s)	2860 (m)
		1370 (m)	1375 (m)	1370 (m)	2900 (m)	1735 (vs)
		1205-1230 (vs)	1200-1250 (vs)	1000-1100 (vs)	1750 (vs)	1440-1450 (m)
		1000-1100 (s)	1000-1100 (vs)	750 (s)	1375 (s)	1370 (s)
		905 (m)	895 (s)	698 (s)	1220-1240 (vs)	1220-1240 (vs)
	888 (m)	875 (m)		1000-1100 (vs)	1170 (w)	
				760 (m)	1030-1040 (s)	
				748 (m)	970 (m)	
				697 (m)	925 (m)	
					888 (m)	
NMR	δ (ppm)	5.8/d (1H, anomeric)		7.38/m (5H, arom.)	7.4/m (5H, arom.)	3.7-5.5/m (12H, C-H)
		5.0-5.5/m (3H, H2, 3, 4)		5.5/s (1H, benzylic)	5.5/s (1H, benzylic)	3.7/s (3H, COOCH ₃)
		4.2/d (1H, H-5)		4.7/d (1H, arom.)	4.8-5.3/m (5H, H1)	3.4/s (3H, CH ₃ O)
		3.7/s (3H, COOCH ₃)		J = 3.7 Hz	3.3-4.35/m (6H, H2)	1.9-2.2/s (18H, AcO×6)
				3.5, 4.4/m (6H, CH)	3.75/s (3H, COOCH ₃)	
				3.4/s (3H, CH ₃ O)	3.4/s (3H, CH ₃ O)	
				2.9/bs (2H, OH)	2.1/bs (1H, OH)	
				2.0/s (18H, AcO×6)		

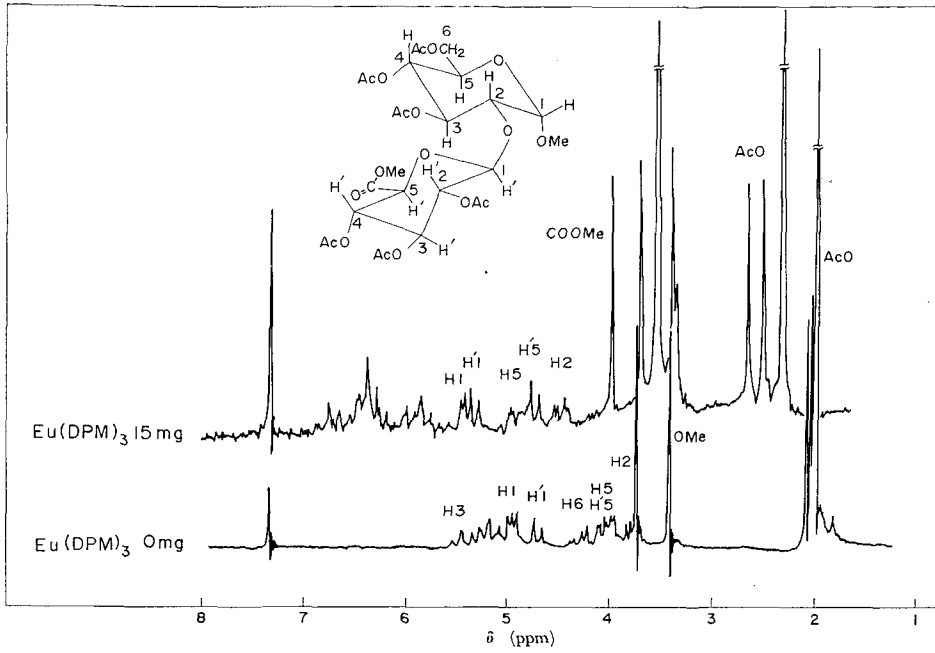


Fig. 39. NMR Spectra of Acetylated Derivative of Sophorobio-uronic acid (15 mg/ CDCl_3 0.4 ml).

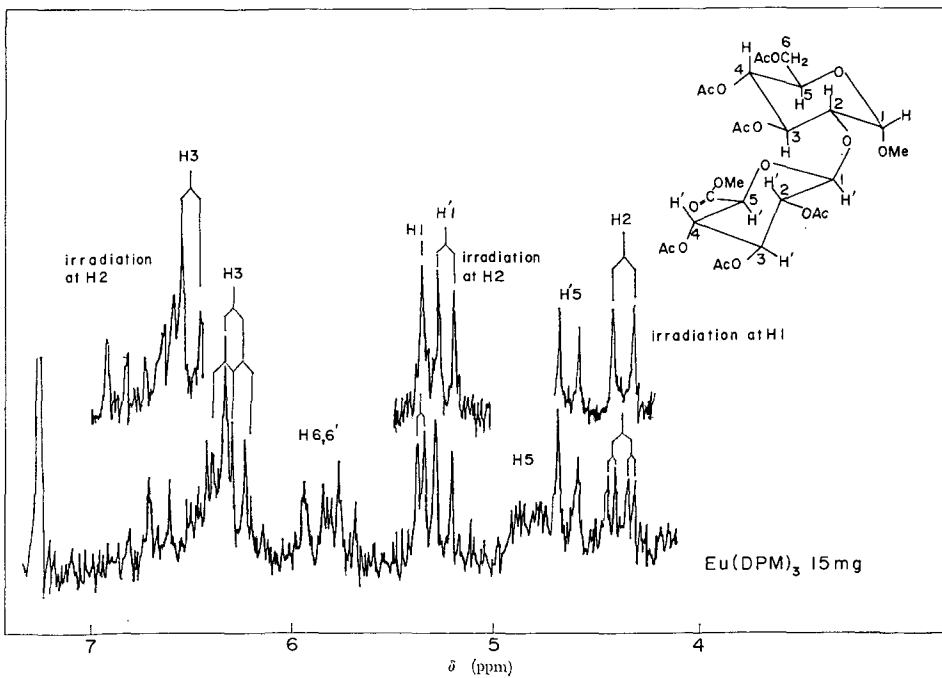


Fig. 40. NMR Spectra of Acetylated Derivative of Sophorobio-uronic acid (15 mg/ CDCl_3 0.4 ml).

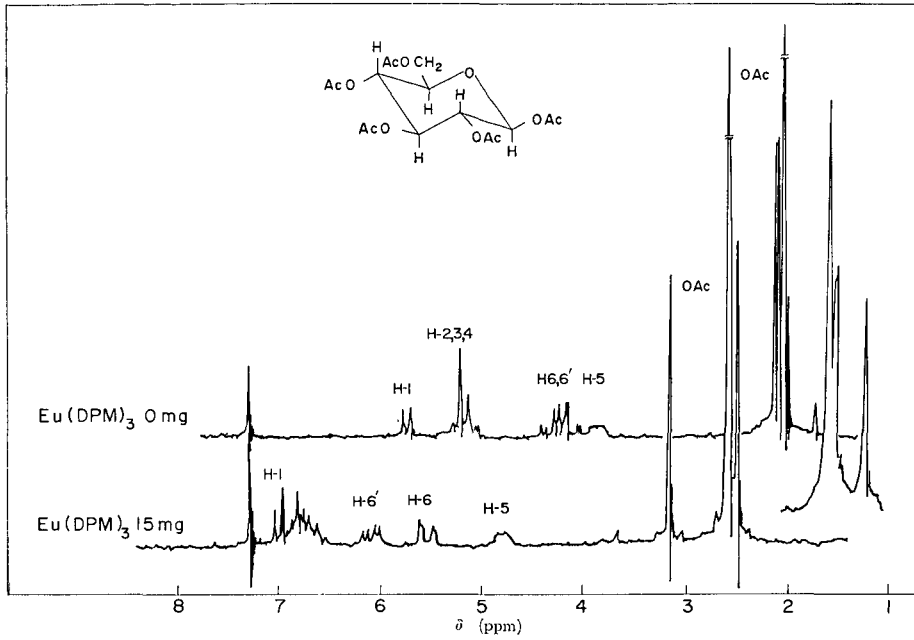


Fig. 41. NMR Spectra of 1,2,3,4,6-Penta-O-Acetyl- β -D-Glucopyranose (15 mg/ CDCl_3 0.4 ml).

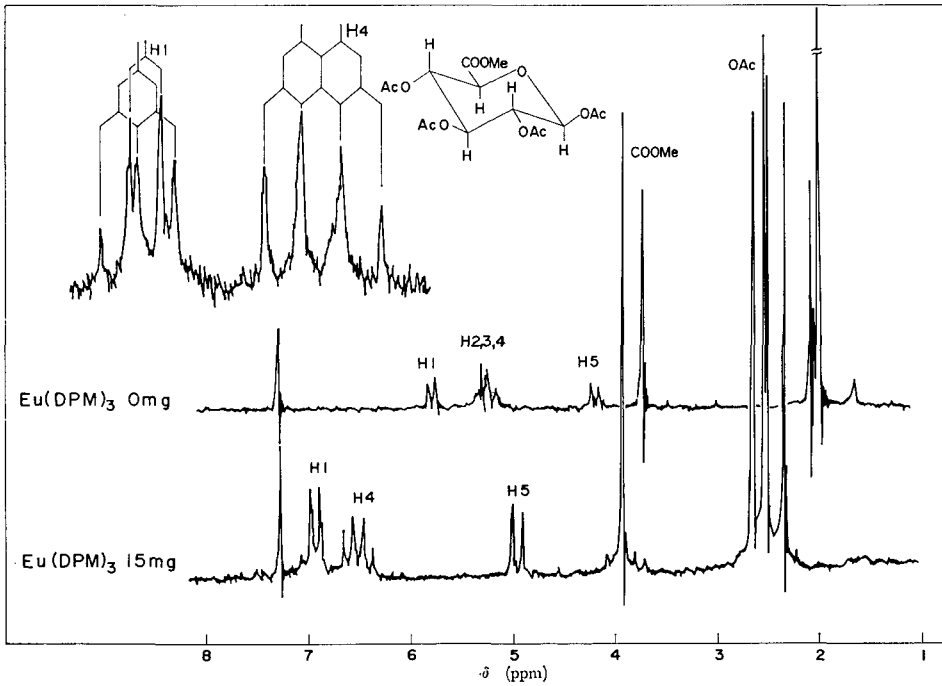


Fig. 42. NMR Spectra of Methyl 1,2,3,4-Tetra-O-Acetyl- β -D-Glucopyranosyl Uronic Acid (15 mg/ CDCl_3 0.4 ml).

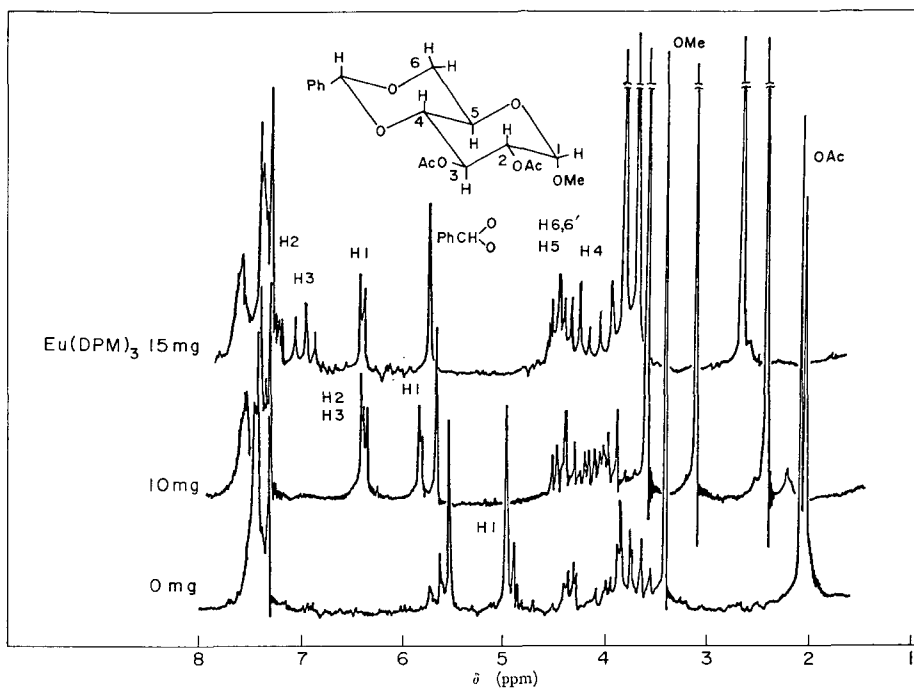


Fig. 43. NMR Spectra of Methyl 2,3-Di-O-Acetyl-4,6-O-Benzylidene α -D-Glucopyranoside (15 mg/ CDCl_3 0.4 ml).

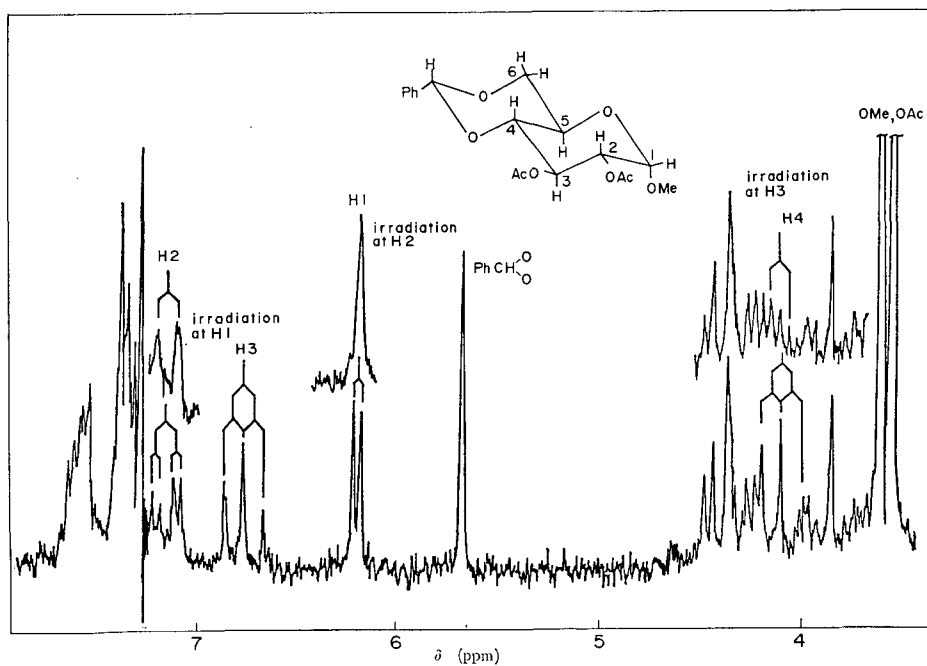


Fig. 44. NMR Spectra of Methyl-2,3-Di-Acetyl-4,6-O-Benzylidene α -D-Glucopyranoside.

第5節 色素のアグリコン部と糖部の結合位置の決定

前節迄の実験結果から *Salicornia* pigment の構成成分はアグリコン部が Betanidin, 糖部が Sophorobiouronic acid [2-O-(β -D-glucopyranosyl uronic acid)-D-glucopyranose] と決定したが, Betanidin の OH 基に対し糖の還元末端の結合が α 結合か β 結合か, また糖が Betanidin の C-5 位および C-6 位の2個の水酸基のどちらに結合しているかを確認するため次の実験を行なった。

5-1 酵素分解による結合の解析

<実験>

Salicornia pigment 水溶液 (6 mg/5 ml) 1 ml に酵素溶液 (Emulsin または β -D-Glucuronidase, あるいは両酵素等量混合物 5 mg, あるいは 5 mg ずつ/0.2 M Acetate buffer, pH 5, 5 ml) 0.5 ml を混合, 37°C, 1時間インキュベートし, PC [溶媒系, BuOH-AcOH-H₂O (4:1:2, v/v)] で分解物の検索を行なった。なお対照物質として, Betanin, およびそのアグリコンである Betanidin を用いた。

<実験結果と考察>

先にこの色素配糖体の糖部は 2-O-(β -D-Glucopyranosyl uronic acid)-D-glucopyranose と決定されたことから糖部である二糖はその Glucose の還元末端を以って結合していることは明らかである。

次に糖部がアグリコンに α 結合しているか, 又は β 結合しているかを決定するため酵素分解を行ない PC 検索をした結果 (Fig. 45), Emulsin (β -D-Glucosidase) 単独では未分解の色素と淡い Betanidin のスポットを与え, β -D-Glucuronidase 単独では未分解の色素と濃い Betanin (Betanidin-5-O- β -D-glucopyranoside) に相当するスポットを与え, β -D-Glucosidase と β -D-Glucuronidase を同時に作用させると未分解の色素と Betanidin と

Betanin に相当するともに濃いスポットが検出された。この結果から糖部はアグリコンに β 結合しているものと決定した。

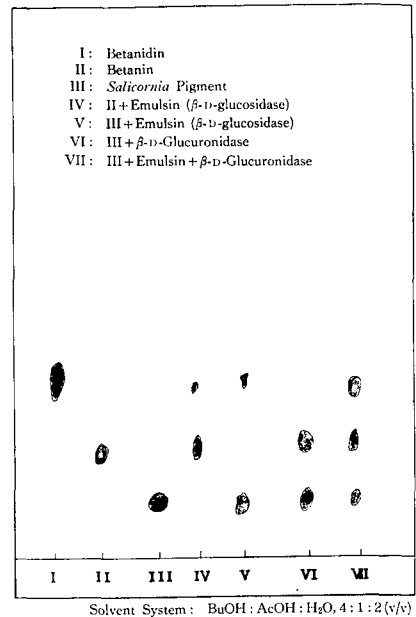
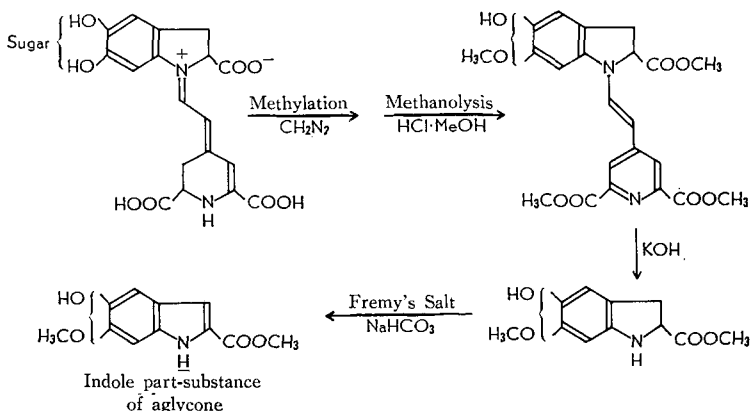


Fig. 45. Paper chromatogram of Enzymic Hydrolyzates of *Salicornia* Pigment.

5-2 アグリコン・インドール部の単離と構造解析

アグリコン部と糖部の結合位置を決定するため, WILCOX, WYLER ら⁶⁹⁾ が赤ビートの Betacyanin である Betanin の構造を決定した際の実験法を参考にして, 次の想定反応経路によりアグリコンの indole 部を取得し, その性質を調べた。



<実験>

(1) メチル化及びメタノリシス：

Salicornia pigment (600 mg) を無水メタノール (100 mℓ) に溶解, 窒素を通して diazomethane [p-toluene sulfonyl methyl nitrosoamide (12 g) から調製] エーテル溶液を添加, 24 時間後, 濾過し, 濾液から溶媒を留去し, 橙色油状残渣を得た。これを 1 N HCl-メタノール (25 mℓ) に溶解し, 脱気し, 50°C で 3 時間加熱メタノリシス後, 溶媒を留去し, アルミナ (酸洗浄, 活性度 II) カラム (φ 1.5×7 cm) に吸着, メタノール・ジクロロメタン (0.5:9.5, v/v) で溶出, 減圧濃縮し橙黄色油状物 (約 75 mg) を得た。

(2) アルカリ分解：

前記のメチル化-メタノリシス生成物 (橙黄色油状物, 約 75 mg) を水 (7 mℓ) に溶解し, 真空ポンプで脱気しながら凍結, 融解を繰返した後, KOH (0.64 g) を添加し, 再び脱気し, 70~80°C で 8 時間加熱し分解した。冷却後, 2.66 N H₂SO₄ (4 mℓ) で中和し, 蒸発乾固し, 乾燥 1 N HCl-MeOH (12 mℓ) を添加, 脱気し 60~70°C で 4 時間加熱後, 加水して NaHCO₃ で pH 7 とし, この溶液に FREMY 塩 (K-nitrosodisulfonate) (0.2 g) を加え, Sørensen-phosphate buffer (pH 8, 5 mℓ) に溶かし, 2 分後酢酸エチルで振り, さらに 5 分後 Na-dithionate (0.5 g) を加え, 有機層を水洗後, Na₂SO₄ で乾燥, 蒸発して得た残渣をシリカゲルカラム (φ 3×20 cm) に吸着, 溶媒 (Benzene-Propionic acid-H₂O, 2:2:1, v/v の上層) で展開溶出した。UV ランプで蛍光を発するバンド

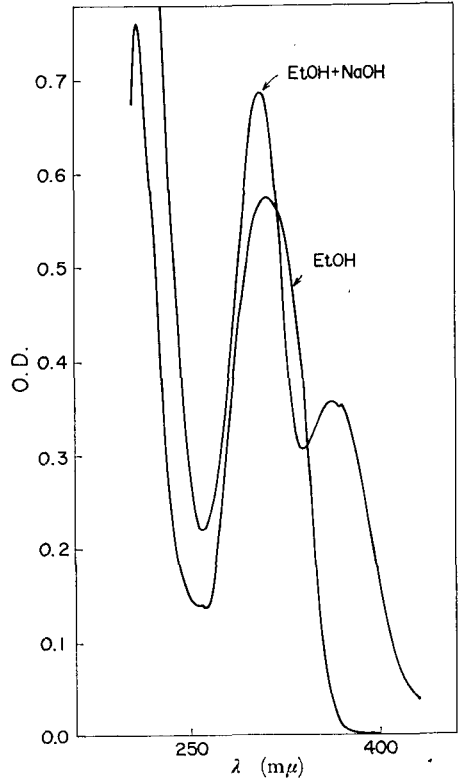


Fig. 46. UV Spectra of "Indole-part Substance".

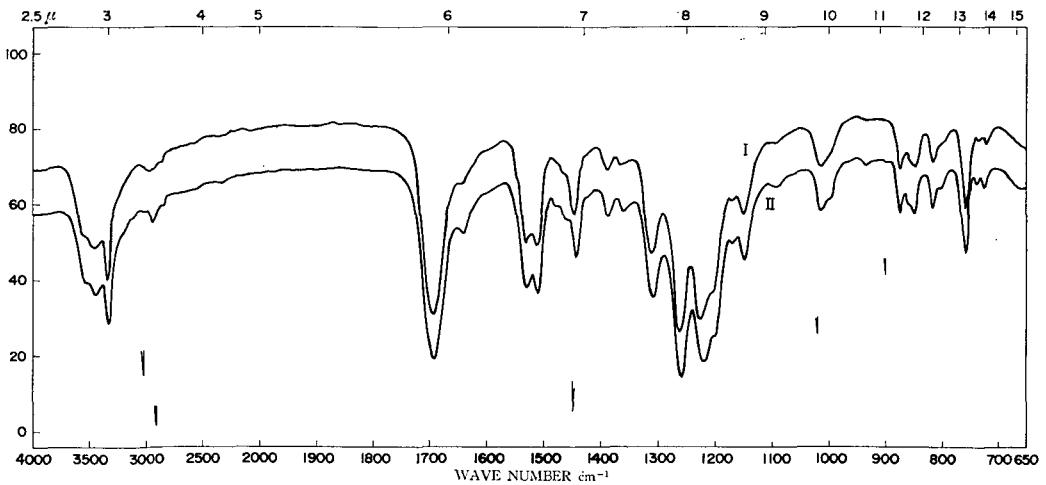


Fig. 47. IR Spectra of "Indole-part Substance" (I) and Synthesized 5-Hydroxy-6-methoxy-indole-2-carboxylic acid methyl ester (II) (KBr).

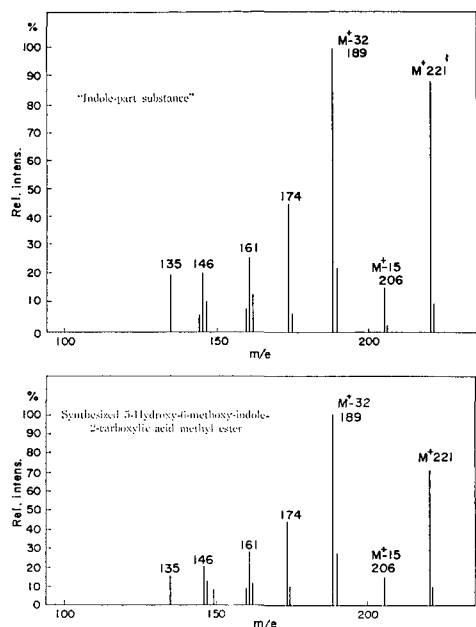


Fig. 48. MS Spectra of "Indole-part Substance" and Synthesized 5-Hydroxy-6-methoxy-indole-2-carboxylic acid methyl ester.

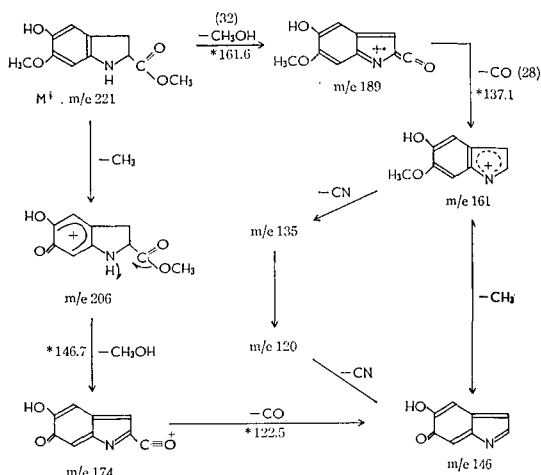


Fig. 49. Estimated Fragmentation Pathway of "Indole-part Substance".

Table 20. Spectral Characterization of "Indole-part Substance" of *Salicornia* Pigment

Anal.	Found.	C%	H%	N%
	Calcd. for $C_{11}H_{11}NO_4$	59.28	5.19	6.29
		59.72	5.01	6.33
UV λ_{max} (m μ)	Fig. 46 (EtOH) 310, (EtOH+NaOH) 305, 363			
IR ν_{max} (cm $^{-1}$) KBr	Fig. 47 3550-3450, 3330 (s), 1690 (s), 1640 (w), 1530 (m), 1510 (m), 1440 (m), 1385 (w), 1360 (w), 1310 (s), 1260 (s), 1220 (s)			
MS (m/e)	Fig. 48 221 (M $^+$), 206, 189, 174, 161, 146, 135			
NMR δ (ppm)	Fig. 50 (CDCl $_3$)	Fig. 51 (CD $_3$) $_2$ SO		
	8.7/b	8.6/b (1H, NH)		
	7.15/s	(1H, C-7)		
	7.07/s	(1H, C-4)		
	6.82/s	6.85/s (1H, vinyl)		
	3.95/s	3.86/s (3H, COOCH $_3$)		
3.88/s	3.78/s (3H, CH $_3$ O)			

を減圧濃縮し、エタノールから再結し、アルカリ分解生成物を淡黄色粒状物 (6 mg, m.p. 168°C) として得た (以下、これを “Indole-part substance” と略記)。

(3) 分析方法

融点, UV, IR, MS, NMR の測定は前に同じ。

<実験結果と考察>

上の実験で得た “Indole-part substance” と次項で述べる合成 5-Hydroxy-6-methoxy-indole-2-carboxylic acid methylester との間で物理・化学的性質を比較し同定を行なった。各スペクトルの図から得たデータは一括して表にあげてある (Table 20)。

淡黄色粒状 “Indole-part substance” (m.p. 168°C) は合成物 (m.p. 168°C) と混融して融点降下せず、元素分析の結果、 $C_{11}H_{11}NO_4$ の分子式と一致し、MS (Fig. 48, Table 20) で理論分子量に合致する親ピーク (M^+) m/e 221 が検出された。

UV (Fig. 46, Table 20), IR (Fig. 47, Table 20) でも “Indole-part substance” は合成物のそれと一致した。

MS の各フラグメントについては “Indole-part sub-

stance” と合成物のそれは同一で、Metastable ion からの計算と、他のインドール化合物の開裂様式³⁶⁾を参考にし推定して帰属を行ない満足すべき結果を得た (Fig. 49)。

NMR (溶媒 $CDCl_3$) (Fig. 50, Table 20) では、 δ 7.07 ppm と 7.15 ppm の singlet は C-4 と C-7 の芳香環プロトンで、 δ 6.82 ppm の singlet は C-3 のビニルプロトンに帰属され、 δ 3.95 ppm の singlet はカルボキシメチルプロトンに、 δ 3.88 ppm の singlet は C-6 のメキシプロトンに、ノイズにかき消されていると思われる 8.7 ppm 付近の幅広いピークは N-1 のプロトンに帰属された。(CD₃)₂SO 中でも各プロトンは同様に帰属された (Fig. 51, Table 20)。

以上の解析結果から *Salicornia* pigment から得られた “Indole part-substance” は 5-Hydroxy-6-methoxy indole-2-carboxylic acid methyl ester と同定され、従ってこの色素配糖体の糖部はアグリコン部の C-6 位ではなく C-5 位の水酸基に結合しているものと結論づけられた。

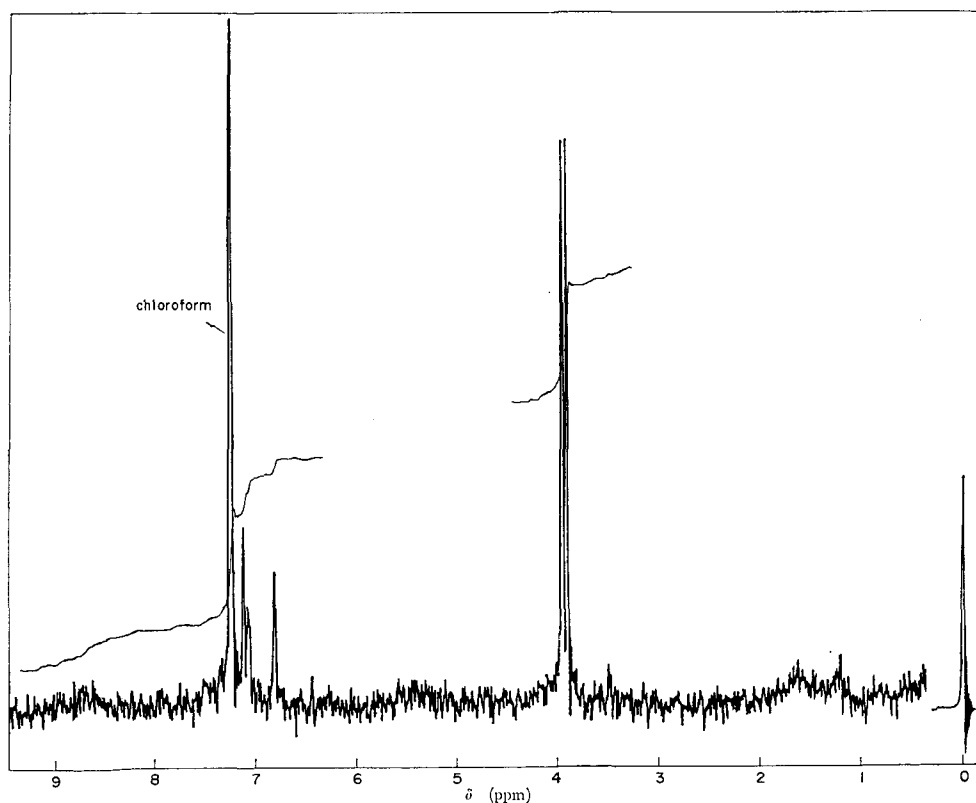


Fig. 50. NMR-Spectrum of “Indole-part Substance” in $CDCl_3$ at 100 MHz.

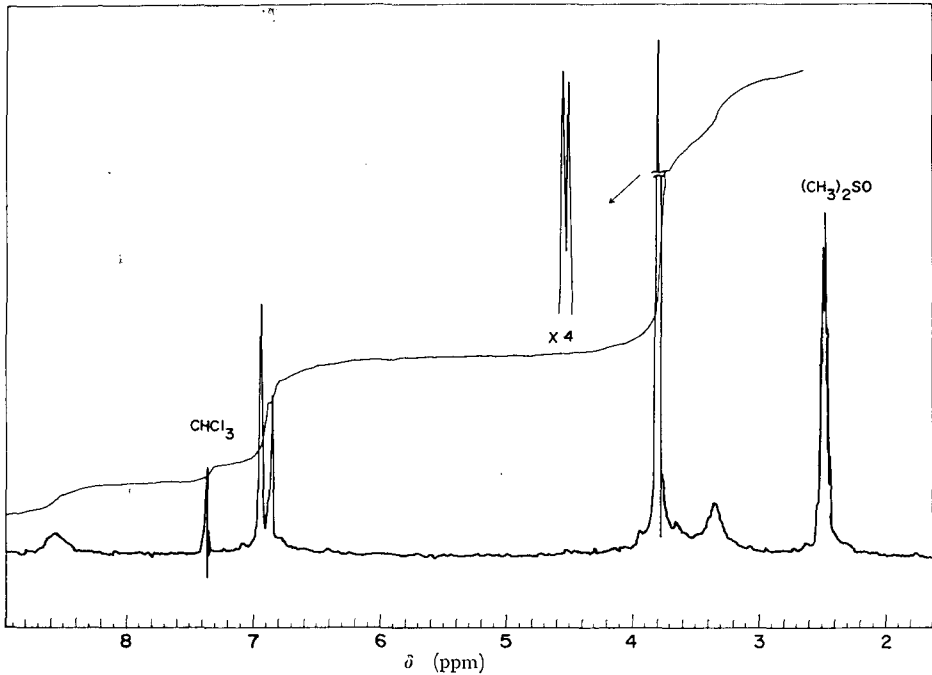
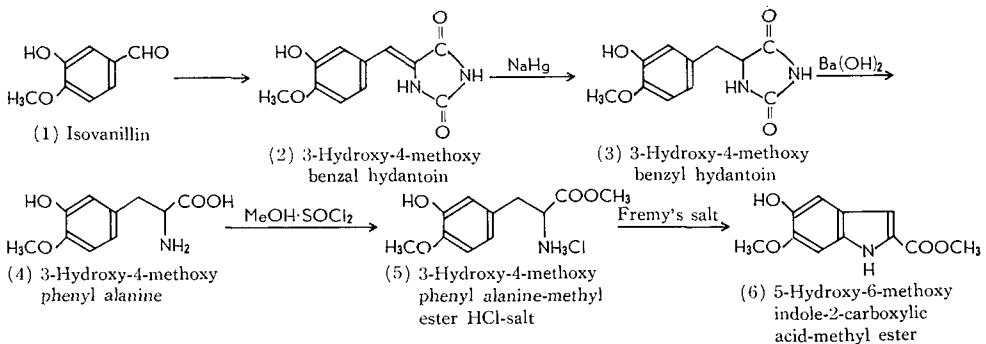


Fig. 51. NMR Spectrum of "Indole-part Substance" in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ at 100 MHz.

5-3 アグリコン・インドール部関連化合物の合成

前項に述べた *Salicornia* pigment のアグリコンのインドール部の構造を確かめるための比較物質とし

て 5-Hydroxy-6-methoxy indole-2-carboxylic acid methylester を WILCOX ら⁶⁹⁾ の方法に従って次の合成経路により合成し、その性質を調べた。



化合物 (4) (1.0 g) を Thionyl chloride-無水メタノール溶液に添加，1時間室温に静置後，逆流冷却下，6時間加熱，溶液を留去し，黄褐色油状物として化合物 (5) を得た。

[5] 化合物 (6) の合成：

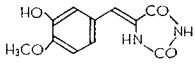
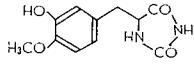
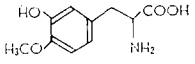
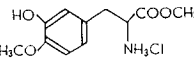
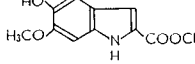
化合物 (5) (750 mg) を水 (25 ml) に溶解，酢酸エチル (60 ml)，FREMY 塩 (1.5 g)， NaHCO_3 (0.56 g)，水 (30 ml) の混合液をゆっくり滴下，30分後， NaCl で飽和，酢酸

エチル層を飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液と水で洗浄， Na_2SO_4 で乾燥，溶媒を留去，熱ベンゼンから再結し，化合物 (6) (60 mg) を得た。

<実験結果と考察>

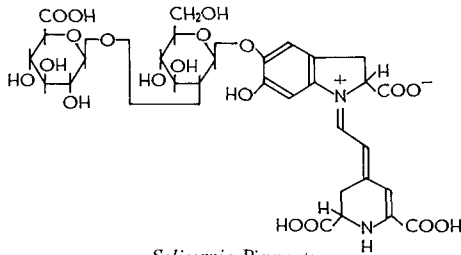
合成取得化合物 (2)~化合物 (6) の各種スペクトルの帰属を含む物理・化学的性質を Table 21 にまとめて載せた。

Table 21. Characterization of Intermediates and Last Product in Synthesis of 5-Hydroxy-6-methoxy-indole-2-carboxylic acid methylester

										
	$C_{11}H_{10}O_4N_2$ Compd. (2) white needle	$C_{11}H_{12}O_4N_2$ Compd. (3) white needle	$C_{10}H_{13}O_4N$ Compd. (4) white powder	$C_{11}H_{16}O_4N \cdot Cl$ Compd. (5) syrup.	$C_{11}H_{11}O_4N$ Compd. (6) pale yellow granule					
M.p. (°C)	276-280			193	265-270	—	168			
Anal.	Found.	C% 56.53 H% 4.25 N% 12.07	C% 55.94 H% 5.15 N% 11.81	C% 56.72 H% 6.44 N% 6.30	—	C% 59.63 H% 5.12 N% 6.26				
	Calcd.	C% 56.45 H% 4.29 N% 11.95	C% 55.90 H% 5.09 N% 11.90	C% 56.86 H% 6.20 N% 6.63	—	C% 59.72 H% 5.01 N% 6.33				
UV λ_{max} (m μ)	—		—	(H ₂ O) 267-277, 282-283 (sh.)	(H ₂ O) 276-277, 282-283 (sh.)	(EtOH) 310; (EtOH+NaOH) 305, 363-364				
IR ν_{max} (cm ⁻¹)	3450 (m)	1580 (m)	3450 (s)	1510 (s)	3500 (bw)	1380 (m)	3500 (bw)	1455 (s)	3550-3450	1385 (w)
	3200 (bm)	1510 (s)	3300 (m)	1460 (w)	3200 (bm)	1335 (w)	3200-2800	1390-1380	3330 (s)	1360 (w)
MS m/e	234 (M ⁺)	236 (M ⁺)	211 (M ⁺)	211 (M ⁺)	225 (M ⁺)	221 (M ⁺)				
	219 (M ⁺ -CH ₃)	138 (M ⁺ -99+H)	166 (M ⁺ -CO ₂ H)	166 (M ⁺ -COOCH ₃)	166 (M ⁺ -CH ₃)	206 (M ⁺ -CH ₃)				
NMR δ (ppm)	205	137 (M ⁺ -99)	138	138	138	189 (M ⁺ -CH ₃ OH)				
	191 (M ⁺ -HNCO)	(base peak)	137 (M ⁺ -74)	137 (M ⁺ -88)	137 (M ⁺ -88)	174				
NMR δ (ppm)	163 (191-CO)	122 (137-CH ₃)	(base peak)	(base peak)	(base peak)	161				
	148 (163-NH)	94 (122-CO)	123	123	123	146				
NMR δ (ppm)	134	120	122	122	122	135				
	(CD ₃) ₂ SO	(CD ₃) ₂ SO	CF ₃ COOH	CF ₃ COOH	CDCl ₃	(CD ₃) ₂ SO				
NMR δ (ppm)	10.9/bs (1H) NH×2	10.3/bs (1H) NH×2	7.25/bs (2H, NH ₂)	7.2/bs (2H, NH ₂)	8.7/b	8.6/b (1H, NH)				
	10.1/bs (1H) OH	8.7/bs (1H) OH	6.97/s (3H, aromatic)	7.0/bs (3H, aromatic)	7.18/s	6.95/s (1H, C-7)				
NMR δ (ppm)	8.7/bs (1H)	7.8/bs (1H)	4.55/bm (1H, CH)	4.6/bm (1H, CH)	7.09/s	(1H, C-4)				
	7.15-6.85/m (3H, aromatic)	6.8-6.5/m (3H, aromatic)	3.93/s (3H, CH ₃ O)	4.05/s	6.83/s	6.85/s (1H, vinyl)				
NMR δ (ppm)	6.3/s (1H, vinyl)	4.2/t (1H, CH)	3.5/dd (1H) CH ₂	3.95/s	3.96/s	3.88/s				
	3.8/s (3H, CH ₃ O)	3.7/s (3H, CH ₃ O)	3.2/dd (1H) CH ₂	3.15-3.65/bm (2H, CH ₂)	3.88/s	(3H, COOCH ₃)				
NMR δ (ppm)		2.7/d (2H, CH ₂)				3.77/s (3H, CH ₃ O)				

第6節 総合考察

前述したすべての実験結果を総合して、あっけしそう (*Salicornia europaea* L.) の葉茎部から結晶状に単離した紫赤色素の化学構造は“Betanidin-5-O-[2-O-(β -D-glucopyranosyl uronic acid)]- β -D-glucopyranoside”と決定した。



Salicornia Pigment
Betanidin-5-O-[2-O-(β -D-glucopyranosyl uronic acid)]- β -D-glucopyranoside

この構造は先に PIATTELLI^ら 46,53) が、けいとう (*Amaranthus tricolor* L.) の葉から単離し、構造を決定して Amarantin と命名した色素化合物と同一のものであった。唯、原報を入手できず抄録によるより他はなく確実ではないが、彼らは Amarantin の構造決定を裏付けるデータとして、 β -D-Glucuronidase を作用させた場合、Betanidin を生じたとあるが、もしそうだとすれば、Amarantin の糖部は Glucuronyl glucose ではなく Glucosyl glucuronic acid の構造である可能性もあり、提示した Amarantin の構造を証明するデータとはならないものと考えられる。著者のこの酵素を用いた実験では Betanidin は決して生ぜず、Betanin のみが生じ、 β -Glucuronidase と β -Glucosidase の混合使用によってはじめて Betanidin を生じることが確かめられた。

さらに彼らはアグリコン部の結合位置についても明瞭に裏付けるデータを記載していないようであるが、著者の実験では結合位置を明確にすることができた。

一方、彼らは Amarantin の他にその C-15 Stereoisomer である Isoamarantin を単離したと報告しているが、著者の単離した色素については立体化学的検討は行なわなかったため、どちらの Isomer であるかは不明である。

Amarantin はけいとうから初めて分離されて後、同じく PIATTELLI ら一派によって、とさかけいとう (*Celosia cristata* L.) の紫花³⁵⁾ から Celosianin などとともに、*Iresine herbistii* HOOK の葉³⁵⁾ から Iresinin-I などとともに、また、せんちこう (*Gomphrena globosa* L.) の花³⁴⁾

から Gomphrenin-I とともに微量に単離されている。

これらのうち Celosianin は Betanidin-5-O-glucopyranosyl glucoside の p-Coumaroyl および Feruloyl 誘導体 (p-Coumaroyl 基は D-Glucose の C-6 位に、Feruloyl 基は D-Glucuronic acid に結合) の構造をもち³⁵⁾、Iresinin-I は Betanidin-5-O-[2-O-(β -D-glucopyranosyl uronic acid)-6-O-(3-hydroxy-3-methyl glutaryl)]- β -D-glucopyranoside であるとされている³⁵⁾。即ちこれらはいずれも糖部にフェノール酸あるいはオキシ酸の結合した Betacyanin 色素である。

先に著者の実験であっけしそう (*Salicornia europaea* L.) から初めて色素を単離した時、予備実験でこれが Amarantin あるいは Iresinin-I によく似ていると記述したが、この色素でも分子の糖部分に脂肪酸やフェノール酸の結合している可能性を考え、アルカリ加水分解を行ない、PC, TLC, PE でブロムフェノールブルーや塩化第二鉄反応、紫外線照射などによりこれらの有機酸の検出を行なったが、すべて negative な結果を示し、糖部分には脂肪酸、あるいはフェノール酸は結合していないことが確かめられた。

一方、単離操作中、とくにイオン交換処理で結合有機酸が脱離する可能性もあるが、これまで単離、確認されたフェノール酸、あるいは脂肪酸結合 Betacyanin 類の分離、精製法と同様の方法を採用したので、その恐れはなかったものと考えられる。

最後に、*Salicornia fruticosa* L. の葉の色素の定量研究⁴²⁾ で全 Betacyanin 中 Amarantin が 8%、Celosianin が 55% を占めると言う報告があるが、著者の供試した *Salicornia europaea* L. では Celosianin の存在は認められなかった。このことは植物種の差異によるものかどうか、将来 *Salicornia* 属植物相互間の比較研究で確かめられねばならぬ問題と考える。

第7節 色素の食品着色料への応用の適否

食品の味覚向上にその色調は大切な要因であるが、食品の加工に際し、天然の色が長く保持されることは少なく、このため、より安定な合成色素、特にタール系色素が広く利用されてきた。しかしそのあるものは、長期間の摂取で、内臓疾患あるいは発ガン性の恐れもあるなど近年とくにその有害性が問題となってきた。

このことからそれに代って天然色素が注目され、多くの研究がなされているが、安定性に問題があり、市販されている天然色素も必ずしも安定とは言えない。

そこであっけしそうの紫赤色素 (*Salicornia* pigment, 以下色素と略記) についても食品着色料への応用

の適否を判定するため、その安定性について調べた。また同時にこの色素を Neobetanidin 構造に変換させて得られる橙色色素の安定性についても実験を行なった。

<実験>

(1) *Salicornia* pigment の安定性実験

1) 温度の影響

色素水溶液 (100 γ /ml, pH 6.5, 10 ml) を試験管に入れ室温, 4°C, -20°C で保存し、一定期間毎に退色変化を自記分光光度計で吸光度 (以下 O.D. と略記) を測定して判定した。なお-20°C の保存の場合は、O.D. の測定は凍結した色素液を室温で融解させた後行なった。

2) pH の影響

次の緩衝液 3 種を用い室温における退色と pH の関係を (1) と同様にして測定した。

(A) pH 1~3: 1 M 酢酸-1 N HCl

(B) pH 3~7: 0.125 M クエン酸-0.25 M リン酸ナトリウム

(C) pH 7~9: 0.04 M ベロナール-0.2 N HCl

3) アスコルビン酸添加の影響

色素溶液 (100 γ /ml McIlvaine buffer pH 3 あるいは pH 5, 10 ml) に 0, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.10% 濃度になるよう抗酸化剤としてアスコルビン酸を添加, 室温に静置, 一定時間毎に O.D. を測定し退色防止効果を検した。

4) Cysteine 添加の影響

上記と同様の溶液に Cysteine 濃度が 0, 0.01, 0.10, 1.00% になるように添加, 上記と同条件で O.D. を測定し, 同様退色防止効果を検した。

5) エタノールの影響

色素溶液 (40 γ /1 ml 98% EtOH あるいは 50% EtOH) を上記と同条件で O.D. を測定した。

(2) Neobetanidin 誘導体の安定性実験

前節で合成した 5,6-Di-O-methylneobetanidin trimethyl ester のメタノール, あるいは HCl 酸性メタノール溶液 (4 γ /1 ml MeOH, または 0.01 N HCl-MeOH) と, 対照としてとった Betanidin メタノール溶液とを室温, あるいは 4°C に放置し, 一定時間毎に次ののべるそれぞれの溶液の吸収極大波長における O.D. 変化を測定した。

溶液の吸収極大	$[\lambda_{max} (m\mu)]$
Betanidin の場合	{MeOH 溶液中 560
	{HCl 酸性 MeOH 溶液中 540
Neobetanidin 誘導体の場合	{MeOH 溶液中 400
	{HCl 酸性 MeOH 溶液中 510

<実験結果と考察>

(1) *Salicornia* pigment の安定性

1) 温度の影響

色素水溶液 (pH 6.5) は比較的高い室温 (25~30°C) では 2 週間で O.D. が約 35% に低下した (Fig. 52)。また, 室温 (15~20°C), 4°C, あるいは -20°C での O.D. 測定の結果を退色率に換算してあげてみると (Fig. 53), -20°C では 50 日以上たってもほとんど退色せず, 4°C では徐々に退色が進み 50 日で約 25% の退色率であった。しかし室温では約 1 週間で 25%, 3 週間で約 50% 退色した (Fig. 53)。

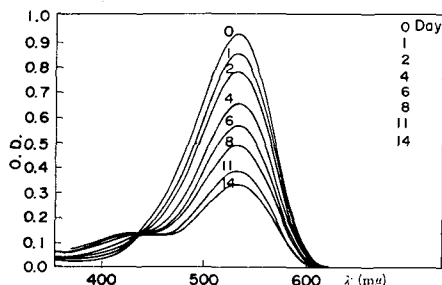


Fig. 52. Decolorization of *Salicornia* Pigment in Aqueous Solution at Room Temperature.

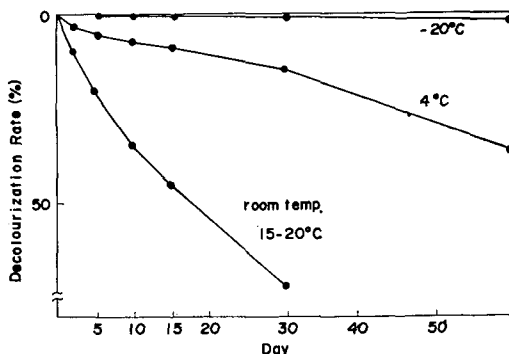


Fig. 53. Decolorization of *Salicornia* Pigment in Aqueous Solution at Several Temperatures.

2) pH の影響

各 pH における退色変化を見た結果 (Fig. 54), どの pH でも退色が進むが, pH 4 から pH 5 の間で比較的安定であった。

3) アスコルビン酸添加の影響

この色素の分解過程はよく知られていないが, もし酸素によって酸化分解を受けるとするなら, 抗酸化剤の添

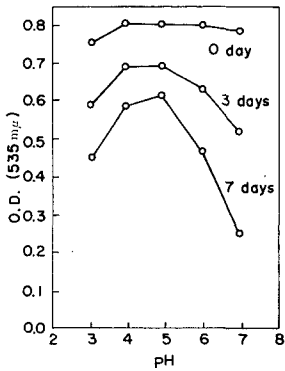


Fig. 54. Decolorization of *Salicornia* Pigment at Several pH's.

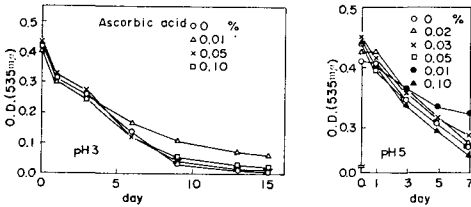


Fig. 55. Decolorization of *Salicornia* Pigment in Aqueous Solution under Existence of Ascorbic acid (pH 3 and pH 5).

加で退色を妨げ得るのではないかと考え、一般に使用されているアスコルビン酸の添加を試みたが (Fig. 55), 試験した添加濃度の範囲では pH 3, pH 5 のいずれの場合にも, 添加しない時と比較して, ほとんど効果がなかった。

4) Cysteine 添加の影響

Sulphydryl 基を有するために還元作用をもつ Cysteine の添加の場合 (Fig. 56) には, わずかに添加効果があり, 退色が抑えられたが, 充分効果的とは言えなかった。

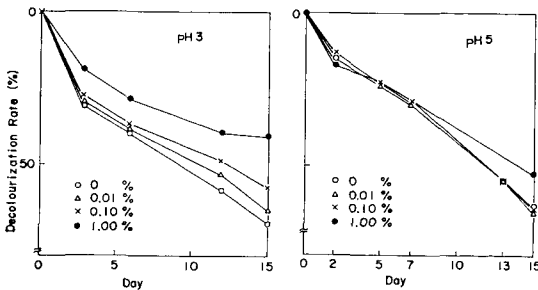


Fig. 56. Decolorization of *Salicornia* Pigment in Aqueous Solution under Existence of Cysteine (pH 3 and pH 5).

5) エタノールの影響

且つて Betacyanin の 1 種が 19 世紀初めに欧州でブドウ酒の着色料に使用されていたことから, この色素のアルコール溶液中での挙動をスペクトルの変化から測定した結果 (Fig. 57), 安定化すると予想に反して急激に退色が進み, 24 時間後には既に 530 mμ のピークはほとんど消失し, 新たに 450 mμ にピークが現われたが, このピークも時間とともに減少した。

その原因については不明であるが, ともあれこの色素

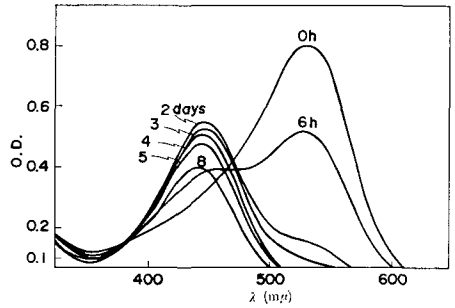


Fig. 57. Spectral Changes of *Salicornia* Pigment in Ethanolic Solution at Room Temperature.

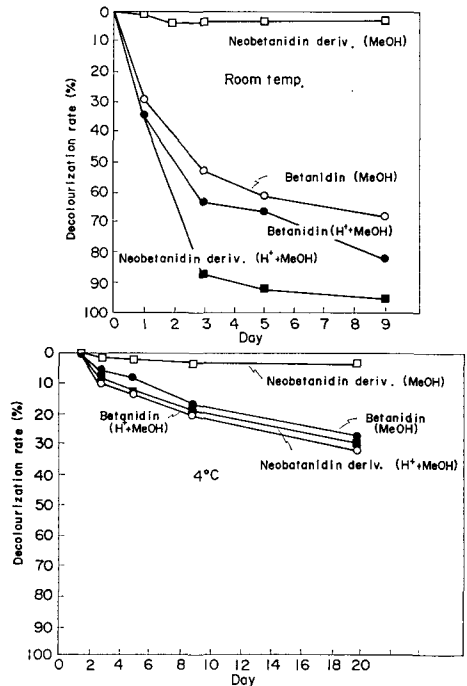


Fig. 58. Decolorization of Betanidin and Neobetaindin Derivative in Methanol.

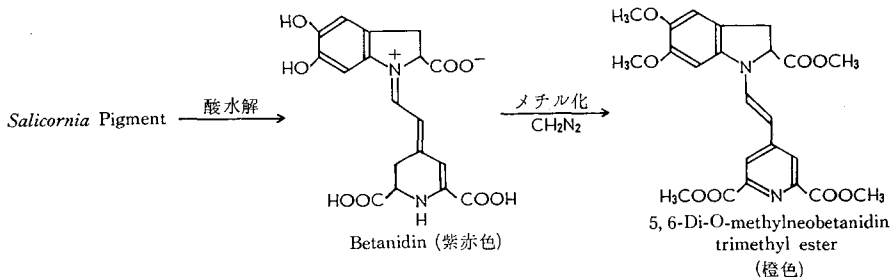
はアルコール溶液中では非常に不安定であることが明らかにされた。

(2) Neobetainidin 誘導体の安定性

次にこの色素を誘導体に変えた場合に、安定性がどう変わるかについて調べた。

そこであけしその色素から次のようにして加水分解によって得た Betainidin (紫赤色) をジアゾメタンで

メチル化し Neobetainidin 誘導体 (橙色) に変換し、この誘導体をメタノール、あるいは塩酸酸性メタノール溶液とし室温と 4°C に放置し、対照として Betainidin の同様の溶液を用いて、その変化を比較測定した結果 (Fig. 58), メタノール溶液の場合は室温, 4°C どちらの場合も Neobetainidin 誘導体は対照の Betainidin に比べ非常に安定で、ほとんど退色しないことが明らかにされた。



しかし、塩酸酸性メタノール溶液では色は赤紫となるが、この赤紫色は不安定であった。

Betacyanin は W·H·O 指定の食品着色用天然色素ではあるが、この類に属する今回供試した *Salicornia* pigment は実験結果の示すとおりかなり不安定であり、食品着色料として好適とは言えないと結論せざるを得なかった。

安定化の方法に関しては BOEUCHAVA ら⁵⁾ が茶葉の Tannin-catechin complex が Betacyanin の 1 種, Betainin, の酵素による分解退色を防止できたとする報告しかない。今回の実験でも安定化のための適切な方法を見出し得なかった。唯、この色素を Neobetainidin 誘導体に変換すると比較的安定化はすることが見出されたが、色は橙色であるため紫赤色を目的とする用途には使用できない。液を酸性化すると紫赤色に変化はするが、この色は Betainidin の場合と同じく不安定であった。

第 3 章 まつばぼたんの黄色色素について

まつばぼたん (*Portulaca grandiflora* HOOK.) はあけしそや赤ビートなどと同様、中心子目 (Centrospermae) に属するすべりひゆ科 (Portulacaceae) の植物で、紫、赤、黄、白など色とりどりの花を咲かせる南米原産の一年生植物であるが、現在では普通に栽培されており、繁殖力が大なため“ほろびんそう”の異名がある。

Portulaca 属植物の色素成分の研究としては、DREIDING¹¹⁾, MABRY^{28,29)} の二つの総説と PIATTELLI ら⁴⁵⁾, REZNIK⁶⁰⁾ の研究によると、赤色色素 Betacyanin 類が *P. grandiflora* HOOK, *P. oleracea*, *P. pilosa* の

花などに含まれることが定性的ではあるが確かめられている。

しかし *Portulaca* 属の黄色色素 Betaxanthin 類の研究は少なく、REZNIK^{58,60)} が *P. grandiflora* の花の PC による定性により黄～橙黄色素の存在を認めたものが唯一とあってよい。

同様、この属の Betaxanthin 類色素の分離研究も、PIATTELLI ら⁴⁸⁾ が *P. grandiflora* の花から Hydroxyproline を構成成分とすること以外は構造未詳の Portulaxanthin と名付けたものを分離した研究が、唯一のものである。

著者は先に第 1 章で述べたように、中心子目植物の Betalain 類色素を検索中、まつばぼたんの栽培品種 Orange あるいは Yellow 種の黄色花卉から PC, PE で Indicaxanthin と推定される Betaxanthin 類色素を検出したが、ここではこの橙黄色色素の単離、物理・化学的性質の測定、および合成 Betaxanthin との比較を試み、その構造を確認したのでこれを次に記述する。

第 1 節 色素の単離、物理・化学的性質と同定

<実験>

供試植物:

まつばぼたん (*Portulaca grandiflora* HOOK. c. v. Yellow) は花色の最も美しい夏に、札幌市“札幌採種園”あるいは北海道大学農学部附属農場で栽培してあったものから、花卉を摘取り、直ちに -20°C に保存したものを供試した。

色素の単離:

まつばぼたんの黄色花卉 (1 kg) をメタノール (5 l) で

抽出, 約 500 ml まで減圧濃縮 (30°C) し, 1 N HCl で pH 3 に調整後, 遠心分離し, 上澄液を低温室 (4°C) 内で Dowex 50 W-X 2 (H⁺) カラム (φ 4.2×70 cm) に吸着, 0.1% HCl (pH 2, 30 ℓ) で洗浄し, 水で色素を溶出, 溶出液 (12 ℓ) を約 150 ml まで減圧濃縮 (30°C) し, Polyamide カラム (φ 4×74 cm) に吸着, 0.1% HCl で溶出し, 先に溶出してきた主色素の橙黄色フラクションを上

と同様にイオン交換樹脂で精製し, 濃縮液を一旦 P₂O₅ 上で乾燥したのち, セルロースカラム (φ 2×38 cm) に通し, メタノールで展開溶出した。

最初に溶出された橙黄色色素フラクションから溶媒を留去し, 凍結乾燥し, 橙色粉状物として色素 (14 mg) (以下 *Portulaca pigment* と略記) を得た。この単離過程を別図に掲げた (Fig. 59)。

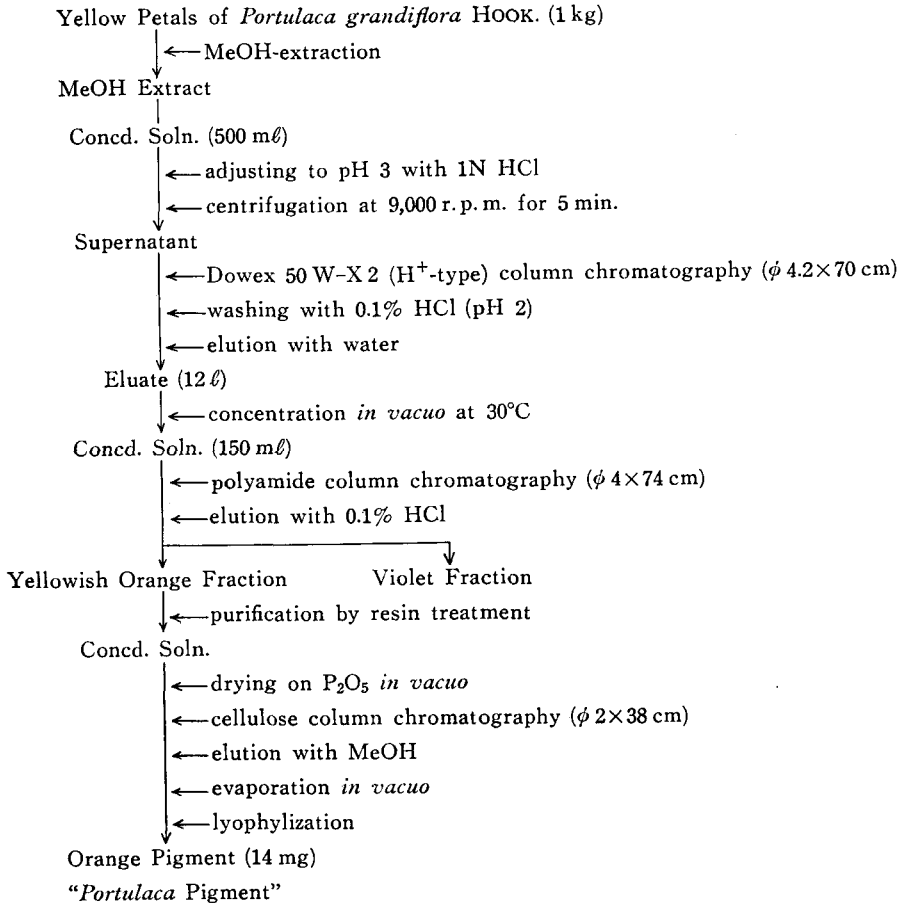


Fig. 59. Isolation of Orange Pigment from Yellow Petals of *Portulaca grandiflora* HOOK.

分析方法:

融点, 元素分析, UV, IR 測定法は第1章記載の方法に準じた。

PC: 東洋濾紙 No. 51

色素検出 (A) 0.1 M Formic acid (pH 2.4)

(B) 0.05 M Pyridine-formic acid (pH 4.5)

分解物検出 BuOH-AcOH-H₂O (4:1:2, v/v)
アミノ酸呈色試薬, Ninhydrin ア
ルコール溶液

PE: 溶媒系, PC の場合の (A), (B) に同じ
泳動条件, 400 V, 16 V/cm, 1 時間

薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略記):
Silicagel plate, 1 N HCl 展開

Betaxanthin-Flavonol 間判別反応： REZNIK⁶⁰⁾ の方法を準用。

<実験結果と考察>

単離した *Portulaca* pigment の物理・化学的性質を後節でのべる合成色素と比較しながら検討を行なった。

“*Portulaca* pigment は明確な m.p. を与えず、黒色に分解した [Indicaxanthin の m.p. 文献値⁵¹⁾ 160~162°C (分解)]。

元素分析の結果 (Table 22) は Indicaxanthin の理論分子式 $C_{14}H_{16}N_2O_6$ に一致した。

Table 22. Elementary Analysis

	C%	H%	N%
Found.	54.36	5.37	9.16
Calcd. for $C_{14}H_{16}N_2O_6$	54.54	5.19	9.09

Portulaca pigment の溶解性はメタノールよりも水に易溶で、Flavonol 色素が反対であるのとは異なっており、また $AlCl_3$ 溶液添加により濃黄橙~橙の比較的濃色の呈色を示した。実験的比較は行なわなかったが、Flavonol 色素が比較的淡色のレモン様黄色を示すと言われるのに相対していた。これらのことから単離黄色色素は Betaxanthin 類の1種と推定された。

UV (Fig. 60) は後節で述べる合成色素と並べてあるが、*Portulaca* pigment は水溶液中で、Betaxanthin 類に特有の λ_{max} (484~485 $m\mu$) を示し、酸性溶液中では若干シフトし 470~471 $m\mu$ の値を示した。一般に Flavonol 色素は λ_{max} 345~360 $m\mu$ の吸収を与えることが

わかっている⁶⁰⁾ ので *Portulaca* pigment は Flavonol 類とは異なり、Betaxanthin 類の1種と推定された。なお単離色素の λ_{max} は L-Proline あるいは L-Hydroxyproline とを用いて転換合成によって取得した合成色素のそれとも一致していた。

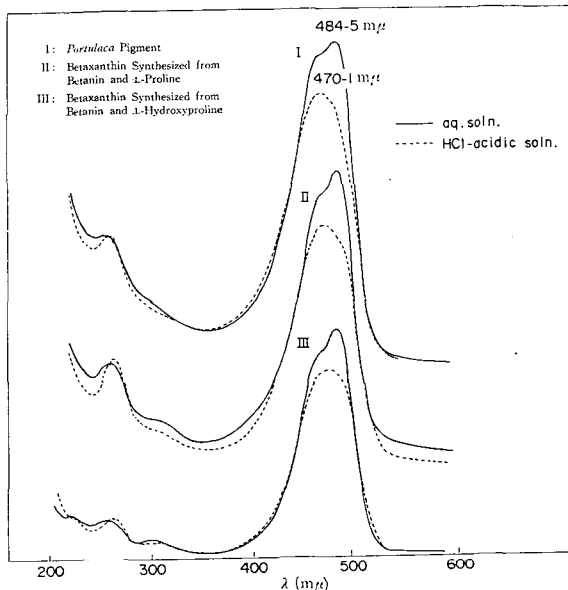


Fig. 60. Absorption Spectra of *Portulaca* Pigment and Synthetic Betaxanthins.

IR (Fig. 61) でも *Portulaca* pigment と L-Proline, あるいは L-Hydroxy proline からの二つの合成色素は吸収がほとんど同じで三者は区別不能であった。

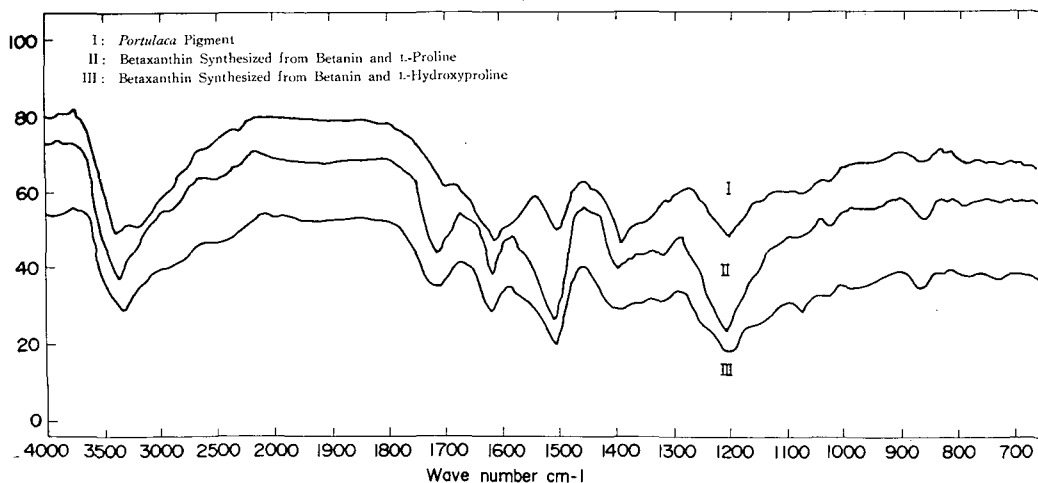


Fig. 61. Infrared Spectra of *Portulaca* Pigment and Synthetic Betaxanthins (KBr pellet).

Table 23. Paper Chromatography and Paper Electrophoresis of *Portulaca* Pigment and Two Synthesized Pigments

	RB		EB	
	Solvent		Solvent	
	A	B	A	B
<i>Portulaca</i> pigment	1.32	0.95	1.5	1.37
Synthesized betaxanthin from betanin and L-proline	1.42	1.04	1.4	1.38
Synthesized betaxanthin from betanin and L-hydroxy proline	1.45	1.1	1.3	1.38

Remarks: Solvent system

A: 0.1 M Formic acid (pH 2.4)

B: 0.05 M Pyridine-formic acid (pH 4.5)

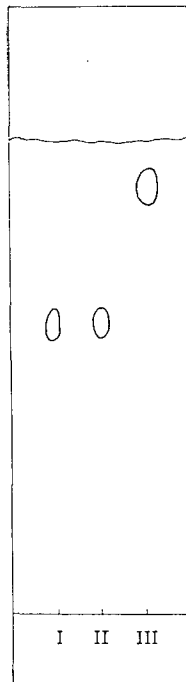
Mobility value

R: Relative Rf value (Betanin 1.00)

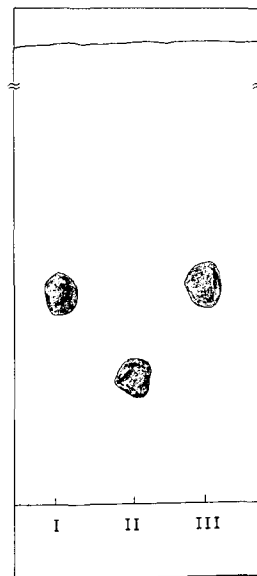
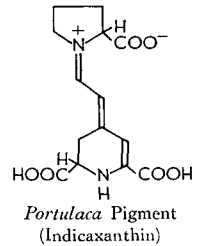
E: Relative electrophoretic mobility (Betanin 1.00)

次に PC, PE を行なった結果 (Table 23), 単離色素と2種の合成 Betaxanthin はほとんど一致した PC-RB 値, PE-EB 値を与え三者を区別できなかった。

そこで TLC (シリカゲル) を行なったところ (Fig. 62), 両合成 Betaxanthin は明瞭に分離し, *Portulaca* pigment は Betanin と L-Proline から合成した Betaxanthin のスポットと一致した。

Solvent: 1N HCl
Silica gel plate**Fig. 62.** Thin Layer Chromatogram of *Portulaca* Pigment and Two Synthesized Betaxanthins.

最後に *Portulaca* pigment の塩酸加水分解で得られたアミノ酸を PC で検索の結果 (Fig. 63), L-Hydroxyproline ではなく L-Proline の Rf 値と一致する Ninhydrin 呈色黄色スポットが検出されたことから, 単離したまつばぼたんの黄色色素は第1章の定性的検索で推定された通り, Betaxanthin の1種 Indica-

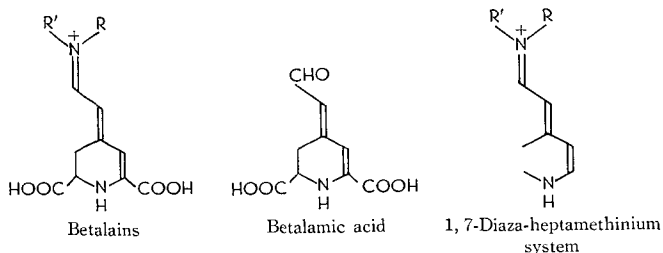
I: L-Proline
II: L-Hydroxyproline
III: *Portulaca* Pigment
Solvent: BuOH-AcOH-H₂O (4:1:2, v/v)
Spray reagent: Ninhydrin**Fig. 63.** Paper Chromatogram of Hydrolyzates of "*Portulaca* Pigment".

xanthin であると同定された。

第2節 関連化合物の合成

既知の Betalain 類色素は共通構造として Dihydro-pyridine carboxylic acid をもち、赤色の Betacyanin

類の場合は R, R' が環状構造をとり、Cyclodopa となっており、黄色の Betaxanthin 類の場合、R' が H となり R にアミノ酸、あるいはアミン類が結合している構造をもつことが知られている。



Betalain 色素の生合成経路は Dopa からまた天然には確実に単離されていない推定中間物質の Betalamic acid を経て、Cyclodopa や各種のアミノ酸やアミン類と結合し生合成されるものと推定されている。

一方、Betalain 類はいずれも WYLER ら⁷⁸⁾ の名付けた基本構造 1,7-Diaza-heptamethinium 系を持ち、この系はもともと、初め ZINCKE ら⁸⁰⁾ によって化学合成的に塩基交換反応を起すことが観察されていたもので、WYLER, WILCOX ら⁷⁸⁾ はこれを応用して Betacyanin の1種 Betanin と L-Proline との塩基交換反応によって Betaxanthin の1種 Indicaxanthin を転換化学合成している。

著者は先にまつぼたんの色素の定性的検索によって Indicaxanthin を推定し、また PIATTELLI ら⁴⁸⁾ が L-Hydroxyproline を構成成分とする Portulaxanthin を単離しているのを、これを考慮して、単離した *Portulaca* pigment に対する比較物質として用いるため WYLER, WILCOX ら⁷⁸⁾ の方法に従い、次に図示する転換反応によって Betanin から両 Betaxanthin を合成した (Fig. 64)。

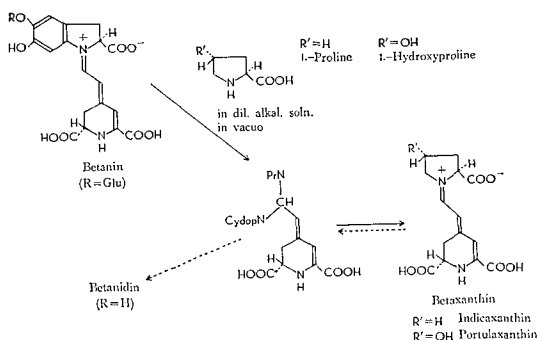


Fig. 64. Conversion from Betanin and L-Amino Acid to Betaxanthin.

<実験>

Betanin から Betaxanthin への転換合成:

精製した Betanin (200 mg) と L-Proline, あるいは L-Hydroxyproline (600 mg) を 0.6 N NH₄OH 水溶液 (20 ml) に溶解し直ちに氷水で冷却しながら真空ポンプで脱気し、1時間室温に静置後、反応液を減圧濃縮した。残渣を水 (20 ml) に溶解し、Polyamide カラム (φ 2.8×32 cm) に吸着、水 (2 l) で洗浄後、0.1% HCl で色素を溶出し、溶出液 (500 ml) を Dowex 50 W-X 2 (H⁺) カラム (φ 2×22 cm) に吸着、0.1% HCl (2 l) で洗浄後、水で溶出、減圧濃縮し、濃縮液を凍結乾燥し、L-Proline を用いた場合は約 10 mg, L-Hydroxyproline を用いた場合は約 13 mg のいずれも汚黄色粉状物として得た。

<実験結果>

両合成色素はともに明確な m. p. を示さず、褐黒色に変色し不定形残渣として残り、250°C でも融解しなかった。いく分不純と思われるが、これ以上精製せずに前節の実験の比較物質として用いた。合成 Indicaxanthin と Portulaxanthin の UV, IR, PC, PE, TLC 的性質は、前節の各図あるいは各表中にあげてある。

第3節 総合考察

以上の各実験によって著者の供試したまつぼたんの橙色色素は Indicaxanthin と同定したが、この色素は PIATTELLI ら⁵¹⁾ によってサボテン (*Opuntia ficus-indica* MILL.) の成熟橙黄色果実から初めて単離され構造の決定された Indicaxanthin と同一のものであり、新しい Betaxanthin ではなかったが、まつぼたんから単離された初めての例である。

先にも述べた通り、原報は入手し得ないので明らかではないが、PIATTELLI ら⁴⁸⁾ はまつぼたん (*Portulaca grandiflora*) から酸加水分解で、Hydroxyproline を与える Betaxanthin の1種を単離して Portulaxanthin

と名付けているので、この点に留意して実験したが著者の単離色素は Portulaxanthin ではなかった。

しかし、第1章で述べた Betalain 類色素の検索ではまつばぼたんの橙色品種の黄～橙色色素として少なくとも二つのスポットが PC, PE で検出されているところから、あるいは他の一つはいわゆる Portulaxanthin である可能性もあるが、精査はしなかった。

要 約

この論文は主としてあっけしそう (*Salicornia europaea* L.) の葉茎に含まれる紫赤色色素の単離、結晶化、化学構造の解明に関するものである。この研究では、さらにこのあっけしそう色素が食品の着色に応用可能であるかどうかについても研究した。あっけしそう色素の構造決定に先立って、北海道地方で入手できる中心子目 (Centrospermae) 植物を使用して betalain 系列の色素の定性的検索を行なった。また、まつばぼたん (*Portulaca grandiflora* HOOK.) の黄色花卉から単離した橙色色素の化学的同定も行なった。

I. 北海道に生育する中心子目植物の Betalain 類色素の検索

一般に、Betalain 類と称せられる色素は二つの群の含窒素色素、即ち赤色の Betacyanin 類と橙黄色の Betaxanthin 類とから成っている。この検索では、北海道に天然に生育あるいは栽培される10種類の中心子目植物〔あかざ科 (Chenopodiaceae) 3種、ひゆ科 (Amaranthaceae) 4種、おしろいばな科 (Nyctaginaceae) 1種、およびすべりひゆ科 (Portulacaceae) 2種；種および栽培品種総数 22〕中の Betalain 類色素の存在を調べた。

各々の植物から抽出した粗色素はペーパークロマトグラフィ、濾紙電気泳動、可視および紫外線スペクトル分析、Betacyanin 類—Anthocyanin 類間あるいは Betaxanthin 類—Flavonol 類間の判別反応分析によって定性的に分析した。

実験結果から、供試した植物の紫赤色色素は全て Betacyanin 類であり、また黄色あるいは橙色色素のほとんど全ては Betaxanthin 類に属するものと結論された。

さらに、次の Betacyanin 類が存在することが定性的に推定された：Betanin (あるいはその異性体) が赤ビート (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.) の2栽培品種、おしろいばな (*Mirabilis Jalapa* L.) の1種、およびまつばぼたん (*Portulaca grandiflora* HOOK.) の4栽培品種に；Amarantin (あるいはその異性体) があかざ (*Chenopodium album* L.) の1種、あっけしそう (*Salicornia*

europaea L.) の1種、けいとう (*Amaranthus tricolor* L.) の3栽培品種、とさかけいとう (*Celosia cristata* L.) の3栽培品種、羽毛けいとう (*Celosia plumosa* L.) の1栽培品種、およびせんにちこう (*Gomphrena globosa* L.) の1栽培品種に；Celosianin (あるいはその異性体) がとさかけいとう (*Celosia cristata* L.) の3栽培品種、および羽毛けいとう (*Celosia plumosa* L.) の1栽培品種に；Gomphrenin 類の1色素がせんにちこう (*Gomphrena globosa* L.) の1栽培品種に；Oleracin-I と-II がすべりひゆ (*Portulaca oleracea* L.) の1種に；また Mesembryanthemin-II と-III がまつばぼたん (*Portulaca grandiflora* HOOK.) の3栽培品種に。

さらにまた、次の Betaxanthin 類の供試植物中の存在が定性的に推定された：Vulgaxanthin が赤ビート (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.) の4栽培品種に；また Indicaxanthin がまつばぼたん (*Portulaca grandiflora* HOOK.) の2栽培品種に。

II. あっけしそう (*Salicornia europaea* L.) の紫赤色色素の単離と構造決定

(1) 色素の単離

北海道網走市能取湖畔塩湿地で採取したあっけしそうの葉茎 (1実験当り新鮮重 30 kg) を破砕し、0.1% 塩酸溶液 (pH 2) で抽出し、抽出液を Amberlite IR-120 (H⁺型) カラム、次いで Dowex 50 W-X 2 (H⁺型) カラムでクロマトグラフィを行ない、赤色色素を含む溶出液を得た。濃縮した溶出液を Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィしたところ赤紫色のフラクションを与えた。このフラクションを濃縮後 Polyamide カラムにかけ 5% クエン酸溶液 (pH 2.4) で溶出し、それぞれ紫赤、黄、および橙黄色の色素を含む三つのフラクションを得た。紫赤色の主フラクションを Dowex 50 W-X 2 (H⁺型) カラムにかけ、0.1% 塩酸溶液で洗って後、水で溶出し、水溶出液を濃縮して粗結晶を得た。この結晶を水から再結して紫赤色の微細な針状結晶 (200 mg, 収率 0.00067%, m.p. 190°C) を得た。黄色および橙色の色素は極めて微量のため詳細に研究することはできなかった。

単離したあっけしそう色素は Betacyanin 類—Anthocyanin 類間判別試験により Betacyanin 類色素の一つであることがわかり、この色素は Betacyanin 類色素に特徴的な紫外線吸収極大、 λ_{\max} 538, 270, および 295~300 (肩) m μ を示し、Betacyanin 類に一般に観察される周知の赤外線吸収、3420, 3300, 2900, 1720, 1623, 1504 cm⁻¹ などを与えた。単離したこの色素は元素分析 (塩酸塩として、C 47.82%, H 4.96%, N 3.24%, Cl 4.60%)

からは Amarantin あるいは Iresinin-I の 1 同族体であることが推定されたが、核磁気共鳴スペクトル分析によるこの色素の化学構造の解明の企てはそのパターンの複雑さのため不成功であった。

しかし、あっけしそうから初めて結晶の形で単離した色素は先述の実験結果からは Betacyanin 類の一つであり、またその可能な構造は Amarantin, Iresinin-I, あるいは関連色素のそれであることが推論された。

次にあっけしそう色素を 1N 塩酸中で部分加水分解し、生成した加水分解産物をペーパークロマトグラフィーと濾紙電気泳動で調べたところ、それぞれ未分解色素、Betanin (Betanidin-5-O- β -D-glucopyranoside), および Betanidin に相当する三つの赤紫色スポットが検出された。またこの未分解色素は Betanin の分子サイズよりはより大きいサイズをもつ化合物であることがペーパークロマトグラフィー的に推定された。従って、1 分子の Glucose があっけしそう色素のアグリコンである Betanidin に直接結合し、さらに Glucose は、一つあるいはそれ以上の他の糖あるいは他の基に結合していることは明らかである。

(2) アグリコン部の構造決定

あっけしそう色素 (655 mg) を酸加水分解してアグリコンを紫色針状結晶 (80 mg, 塩酸塩) として得た、このものの元素分析、紫外線、赤外線、核磁気共鳴スペクトル分析からアグリコンは Betanidin であると同定した。

アグリコンの核磁気共鳴スペクトルはもとの色素配糖体のそれよりいく分簡単となり、文献中に既報の Betanidin と矛盾しないいくつかの化学シフトを示したが、満足すべき核磁気共鳴分析を行ない得るためにはなお複雑であった。そこで、このアグリコン塩酸塩のメチル化により生成するネオ化合物の核磁気共鳴分析を試みた。

アグリコン塩酸塩をメタノールに溶解し、ジアゾメタンのエーテル溶液中でメチル化し、黄橙色のメチル化物をアルミナ・カラム・クロマトグラフィーし、橙黄色針状結晶として純粋なネオ化合物 (収率, 対出発物質 25%, m.p. 253.3~254.0°C) を得た。このようにして得たネオ化合物の m.p., 元素分析値, 紫外線, 赤外線吸収はそれぞれ 5,6-Di-O-methyl-neobetanidin trimethyl ester のそれと同一であった。後者のネオ化合物はそれより前に別に赤ビートの Betanin から調製しておいたものである。前者のネオ化合物の質量スペクトル分析では、親ピーク (M^+ , m/e 456) が検出でき、ほとんど全ての主フラグメントの解裂経路は合理的に解釈された。また核磁気共鳴スペクトル分析では各々のシグナルは明瞭でこの

化合物のプロトンに完全に帰属できた。

一方、質量スペクトル分析および核磁気共鳴スペクトル分析によるこの化合物の構造分析のための比較物質として、O,O,N-Triacetyl cyclo-dopa methyl ester, 4-Chloro-pyridine-2, 6-dicarboxylic acid dimethyl ester, および (2,6-Dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester を合成し、それらの性質を詳細に研究した。

上述の実験結果から、紫赤色のあっけしそう色素のアグリコンは Betanidin と同定され、色素そのものは糖部がアグリコンの二つの水酸基のどちらかに結合している一つの配糖体であろうと推定された。

(3) 糖部の構造決定

あっけしそう色素の糖部を調べるために、この色素の酸加水分解産物についてペーパークロマトグラフィー、濾紙電気泳動、および二次元ペーパークロマトー濾紙電気泳動分析により糖に対するテストを行なった。4 個の Aniline-phthalate 陽性スポットが検出され、それらはそれぞれ未変化の糖、Glucose, Glucuronic acid, および Glucuronolactone と同定された。ペーパークロマトグラム上の未変化の糖はこれを水で溶出し、もう一度酸加水分解を行ない、加水分解産物をペーパークロマトグラフィーにかけたところ、Glucose, Glucuronic acid, および Glucuronolactone に相当する三つのスポットを与えた。

このようにして、あっけしそう色素の糖部は Glucose と Glucuronic acid とからなる一つの二糖類であろうと推定された。そこでこの二糖類を次の方法によって単離した：色素結晶 (18 g) を過酸化水素で注意深く分解し、分解生成物を Charcoal-Celite カラムクロマトグラフィー、次いで調製ペーパークロマトグラフィーによって精製した。次いで Amberlite IR-120 (H^+ 型) と Amberlite IR-45 (OH^- 型) の 1:1 混合物を充填したカラムで再精製して後、二糖類を白色粉状物 (19 mg) の形で単離した。この粉状二糖類を酸加水分解し、加水分解産物をペーパークロマトグラフィーで調べたところ、Glucose, Glucuronic acid, および Glucuronolactone の存在が明らかにされた。またこの二糖類の酵素的加水分解では、 β -D-Glucuronidase は Glucose と Glucuronic acid をモル比 1:1 で与えたが、 β -D-Glucosidase は何らの分解物をも生じなかった。

これらの結果から、色素の糖部は β -D-Glucosyl-D-glucuronic acid ではなく、Aldobiouronic acid 類の一つである β -D-Glucuronyl-D-glucose であると結論された。

Neobetanidin 誘導体は着色に対していく分安定ではあったが、これは勿論紫赤色着色の目的のために使用することは不可能である。

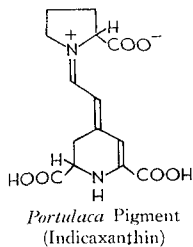
IV. まつばぼたん (*Portulaca grandiflora*

HOOK.) の黄色色素の単離と構造決定

まつばぼたんの黄色花卉 (北海道大学付属農場および札幌採種園で採集したもの, 1 kg) をメタノール抽出し, メタノール抽出液を pH 3 に調整, 遠心分離して得た上澄液を Dowex 50 W-X2 (H⁺ 型) カラムでクロマトグラフィーし, 水溶出液を濃縮した後 Polyamide カラムにかけた。0.1% 塩酸溶液で溶出して得た黄橙色フラクションをイオン交換樹脂処理して濃縮した。濃縮液をセルローズ・カラムに入れ, メタノール溶出クロマトグラフィーを行なった。溶出液から橙色粉末状色素 (14 mg; m.p. 不確定, 暗色化, 分解) が得られた。

単離した色素の元素分析は Betaxanthin 類の 1 種である Indicaxanthin に相当する実験式 (C₁₄H₁₆N₂O₆) を与え, Betaxanthin 類色素に特徴的な紫外線吸収 (λ_{max} 484~485 mμ) を示し, 主な赤外線吸収は, Betanin と L-Proline, あるいは Betanin と L-Hydroxyproline を用いる転換合成によって得た 2 種の Betaxanthin のそれに一致した。ペーパークロマトグラフィーおよび濾紙電気泳動分析ではこれら三つの色素の全てはほとんど同一の R_f 値を与えたが, シリカゲル薄層クロマトグラムではまつばぼたん色素は Betanin と L-Proline とから合成して得た色素に相当するスポットを示した。またまつばぼたん色素の塩酸加水分解によって生成した一つのアミノ酸は L-Proline であることがペーパークロマトグラフィー的に同定された。

上述の結果からまつばぼたん色素は Betaxanthin 同族体の一つである Indicaxanthin であることが確認された。



Indicaxanthin は既にサボテン (*Opuntia ficus-indica* MILL.) の成熟黄色果実から単離され, その化学構造もまた解明されているが, 現在までのところまつばぼたんからこの色素の単離は報ぜられていない。

引用文献

- 1) AINLEY, A. D. and R. ROBINSON: Nitrogenous Anthocyanins. Part III. Preliminary Experiments with Betanidin, *J. Chem. Soc.*, **1937**, 446-449.
- 2) AVIGAD, G.: Rapid, Sensitive Determination of Periodate, *Carbohydr. Res.*, **11**, 119-123 (1969).
- 3) BISCHOFF, H.: *Das Caryophyllinenroth*, Inaug. Diss. Tübingen (1876).
- 4) BLATT, A. H. (ed.): *Organic Syntheses*, Col. Vol. II, 6th printing, John Wiley and Sons, Inc., London, 1943, pp. 126-128.
- 5) BOCUCHAVA, M. A. and G. N. PRUIDSE: The Role of Catechins in the Process of Stabilization of the Red Plant Pigments, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol.*, **1970**(1), 124-126; *C. A.*, **73**, 13254 (1970).
- 6) BOLLENBACK, G. N.: "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. II, ed. by R. L. WHISTLER and M. L. WOLFROM, Academic Press, New York and London, 1963, p. 326.
- 7) BOLLENBACK, G. N., J. W. LONG, D. G. BENJAMIN and J. A. LINDQUIST: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3310-3315 (1955).
- 8) BORKOWSKI, B. und K. DROST: Alkaloide aus *Salicornia herbacea* L., *Pharmazie*, **20**, 390-393 196 (1965).
- 9) BOWERING, W. D. S. and T. E. TIMELL: Synthesis and Characterization of 2-O-(β-D-Glucopyranosyluronic acid)-D-xylopyranose, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2827-2830 (1960).
- 10) COXON, B. and H. G. FLETCHER, JR.: Simplified Preparation of Sophorose (2-O-β-D-Glucopyranosyl-D-glucose), *J. Org. Chem.*, **26**, 2892-2894 (1961).
- 11) DREIDING, A. S.: The Betacyanins, A Class of Red Pigments in the Centrospermae, in W. D. OLLIS (ed.): *Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds*, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1961, pp. 194-211.
- 12) 藤林園子: 生物化学実験法 XI 糖質実験法, 別冊蛋白核酸酵素, 共立出版, 東京, 1968, pp. 136-142.
- 13) GERTZ, O.: *Studier övfer Anthocyan*, Diss., Lund (1906).
- 14) HAGÈNE, P.: Variations in the Ascorbic Acid Content in *Salicornia*, *Compt. rend.*, **246**, 809-812 (1958); *C. A.*, **53**, 16288 (1959).

- 15) HAVERLAND, F.: Beiträge zur Kenntnis der in den Früchten von *Phytolacca decandra* enthaltenen Bestandtheile, Inaug. Diss. Erlangen, (1892).
- 16) HAKOMORI, S.: A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide, *J. Biochem.*, **55**, 205-208 (1964).
- 17) HEISE, R.: Arb. kaiserl. Gesundh. Amte, **11**, 513 (1895).
- 18) HILGER, A.: Landwirtsch. Versuchsstationen, **23**, 456 (1879).
- 19) ITO, K.: Study on the Vegetation of the Salt Marshes in Eastern Hokkaido, Japan, Sapporo Bulletin of the Botanical Garden, Hokkaido University, **No. 1**, 1-102 (1963).
- 20) IMPELLIZZERI, G., M. PIATTELLI and S. SCIUTO: A New Betaxanthin from *Glottiphyllum longum*, *Phytochemistry*, **12**, 2293-2294 (1973).
- 21) IMPELLIZZERI, G., M. PIATTELLI and S. SCIUTO: Acylated Betacyanins from *Drosanthemum floribundum*, *Phytochemistry*, **12**, 2295-2296 (1973).
- 22) KOCHETKOV, N. K. and O. S. CHIZHOV: Mass Spectrometry of Carbohydrate Derivatives, *Adv. Carbohyd. Chem.*, **21**, 39-93 (1966).
- 23) KOCHETKOV, N. K., N. S. WULFSON, O. S. CHIZHOV and B. M. ZOLOTAREV: Mass Spectrometry of Carbohydrate Derivatives, *Tetrahedron*, **19**, 2209-2224 (1963).
- 24) KOENIGS, E. und W. JAESCHKE: Synthese von γ -Alkylierten Pyridinen, *Ber.*, **1921**, 1351-1357 (1921).
- 25) KRZYŻ, F.: *Oestr. Chem. Ztg.*, **23**, 55 (1926).
- 26) KVÁČIK, V., Š. BAUER, J. ROSÍK and P. KOVÁČ: Mass Spectrometry of Uronic Acid Derivatives, *Carbohyd. Res.*, **8**, 282-290 (1968).
- 27) LAWRENCE, W. J. C., J. R. PRICE, G. M. ROBINSON and R. ROBINSON: *Phil. Trans.*, **B 230**, 149 (1939-41).
- 28) MABRY, T. J.: The Betacyanins and Betaxanthins, in T. SWAIN (ed.): *Comparative Phytochemistry*, Academic Press, London, 1966, p. 231.
- 29) MABRY, T. J. and A. S. DREIDING: The Betalaines, in *Recent Advances in Phytochemistry*, Vol. 1, 145-160 (1966) (Pub. 1968).
- 30) MABRY, T. J., A. TAYLOR and B. L. TURNER: The Betacyanins and their Distribution, *Phytochemistry*, **2**, 61-64 (1963).
- 31) MABRY, T. J., H. WYLER, I. PARIKH and A. S. DREIDING: The Conversion of Betanidin and Betanin to Neobetandin Derivatives, *Tetrahedron*, **23**, 3111-3127 (1967).
- 32) MABRY, T. J., H. WYLER, G. SASSU, M. MERCIER, I. PARIKH and A. S. DREIDING: Die Struktur des Neobetandins. 5. Mitteilung. Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin, *Helv. Chim. Acta*, **45**, 640-647 (1962).
- 33) MAKINO, T.: MAKINO's New Illustrated Flora of Japan (in Japanese), The Hokuryukan Co., Ltd., Tokyo, 1961.
- 34) MINALE, L., M. PIATTELLI and S. DE STEFANO: Pigments of Centrospermae-VII. Betacyanins from *Gomphrena globosa* L., *Phytochemistry*, **6**, 703-709 (1967).
- 35) MINALE, L., M. PIATTELLI, S. DE STEFANO and R. A. NICOLAUS: Pigments of Centrospermae-VI. Acylated Betacyanins, *Phytochemistry*, **5**, 1037-1052 (1966).
- 36) 中川有造・池田正澄(訳): 有機化合物のマススペクトル, 丸善, 東京, 1973, pp. 601-618.
H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI and D. H. WILLIAMS: *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, Holden-Day, Inc., San Francisco, 1967.
- 37) PIATTELLI, M. and G. IMPELLIZZERI: Betacyanins from *Lampranthus* sp. (Aizoaceae), *Phytochemistry*, **8**, 1595-1596 (1969).
- 38) PIATTELLI, M. and G. IMPELLIZZERI: 2-Des-carboxybetanidine, A Minor Betacyanin from *Carpobrotus acinacidormis*, *Phytochemistry*, **9**, 2553-2556 (1970).
- 39) PIATTELLI, M. and F. IMPERATO: Betacyanins of the Family Cactaceae, *Phytochemistry*, **8**, 1503-1507 (1969).
- 40) PIATTELLI, M. and F. IMPERATO: Betacyanins from *Bougainvillea*, *Phytochemistry*, **9**, 455-458 (1970).
- 41) PIATTELLI, M. and F. IMPERATO: Pigments of *Bougainvillea glabra*, *Phytochemistry*, **9**, 2557-2560 (1970).
- 42) PIATTELLI, M. and F. IMPERATO: Pigments of Centrospermae. XIV. Betacyanins of Some Chenopodiaceae, *Phytochemistry*, **10**, 3133-3134 (1971).
- 43) PIATTELLI, M. and L. MINALE: Yellow Pigment of the Centrosperm (Betaxanthins), Isolation and Constitution of Opuntiaxanthin, *Rend. Accad. Sci. Fis. Mat. (Soc. Nazl. Sci., Napoli)*,

- 30, 23-28 (1963); C. A., 65, 15303 (1966).
- 44) PIATTELLI, M. and L. MINALE: Pigments of Centrospermae—I. Betacyanins from *Phyllocactus hybridus* HORT. and *Opuntia ficus-indica* MILL., *Phytochemistry*, 3, 307-311 (1964).
- 45) PIATTELLI, M. and L. MINALE: Pigments of Centrospermae—II. Distribution of Betacyanins, *Phytochemistry*, 3, 547-557 (1964).
- 46) PIATTELLI, M. and L. MINALE: Structure of Amarantin and Isoamarantin. II., *Ann. Chim.*, 56, 1060-1064 (1966); C. A., 66, 65805 (1967).
- 47) PIATTELLI, M., L. MINALE and R. A. NICOLAUS: Pigments of Centrospermae—V. Betaxanthins from *Mirabilis jalapa* L., *Phytochemistry*, 4, 817-823 (1965).
- 48) PIATTELLI, M., L. MINALE and R. A. NICOLAUS: Further Research on Betaxanthins, *Rend. Accad. Sci. Fis. Mat.*, 32, 55-56 (1965); C. A., 66, 112959 (1967).
- 49) PIATTELLI, M., L. MINALE and G. PROTA: Isolation and Structure of Indicaxanthine, A β -xanthine from *Opuntia ficus-indica*, *Rend. Accad. Sci. Fis. Mat. (Soc. Naz. Sci. Napoli)*, 31, 39-41 (1964); C. A., 64, 5037 (1966).
- 50) PIATTELLI, M., L. MINALE and G. PROTA: A New Class of Natural Pigment with the Cyanine Chromophore, *Rend. Accad. Sci. Fis. Mat. (Soc. Naz. Sci., Napoli)*, 31, 84-87 (1964); C. A., 64, 2415 (1966).
- 51) PIATTELLI, M., L. MINALE and G. PROTA: Isolation, Structure, and Absolute Configuration of Indicaxanthin, *Tetrahedron*, 20, 2325-2329 (1964).
- 52) PIATTELLI, M., L. MINALE and G. PROTA: Structure of Betanine, *Ann. Chim.*, 54, 955-962 (1964); C. A., 62, 5326 (1965).
- 53) PIATTELLI, M., L. MINALE and G. PROTA: Isolation and Structure of Amaranthine and Isoamaranthine, *Ann. Chim.*, 54, 963-968 (1964); C. A., 62, 7853 (1965).
- 54) PIATTELLI, M., L. MINALE and G. PROTA: Pigments of Centrospermae—III. Betaxanthins from *Beta vulgaris* L., *Phytochemistry*, 4, 121-125 (1965).
- 55) PRICE, J. R. and R. ROBINSON: Nitrogenous Anthocyanins. Part IV. The Colouring Matter of *Bougainvillea*, *J. Chem. Soc.*, 1937, 449-453.
- 56) PUCHER, G. W., L. C. CURTIS and H. B. VICKERY: The Red Pigment of the Root of the Beet (*Beta vulgaris*), 1. The Preparation of Betanin, *J. Biol. Chem.*, 123, 61-70 (1937).
- 57) RAUH, W. und H. REZNIK: Zur Frage der systematischen Stellung der Didiereaceen, *Botan. Jb.*, 81, 94-105 (1961).
- 58) REZNIK, H.: The Pigments of Centrospermae as a Taxonomic Character, *Z. Bot.*, 43, 499-530 (1955).
- 59) REZNIK, H.: S. B. Heidelberg Akad. Wiss., *Math-Nat. Klasse*, 1956, 125.
- 60) REZNIK, H.: Die Pigmente der Zentrospermen als systematisches Element II. Untersuchungen über das Ionophoretische Verhalten, *Planta*, 49, 406-434 (1957).
- 61) RICHTMYER, N. K.: "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. I, ed. by R. L. WHISTLER and M. L. WOLFROM, Academic Press, New York and London, 1962, p. 108.
- 62) RIEGEL, E. R. and M. C. REINHARD: Ultra-violet Absorption of a Series of Eight Organic Substances of the γ -Pyridone Type, in Water Solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 48, 1334-1345 (1926).
- 63) SCHMIDT, O. TH.: Zur Kenntnis der Farbstoffe der Roten Rübe, II., *Z. Naturforsch.*, 12b, 262-263 (1957).
- 64) SCHUDEL, G.: Über die Anthocyane von *Beta vulgaris* L. (var. *rapacea* KOCH, forma *rubra* L.) und *Raphanus sativus* L. (var. *radiculata* PERS.), *Diss. Zürich-ETH* (1918).
- 65) SUSPLUGAS, J., G. PRIVAT, F. GAL and J. PELLECUE: Constituents of *Salicornia fruticosa*, *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 29(2), 133-135 (1969); C. A., 72, 63644 (1970).
- 66) TAYLOR, T. W. G.: *Proc. Roy. Soc.*, 129B, 230 (1940).
- 67) WEETE, J. D., W. G. RIVERS and D. J. WEBER: Hydrocarbon and Fatty Acid Distribution in the Halophyte, *Salicornia bigelovii*, *Phytochemistry*, 9, 2041-2045 (1970); C. A., 73, 127752 (1970).
- 68) WEIGERT, L.: Jahresber. u. Programm d. k.-k. öhol.-pomol. Lehranstalt Klosterneuburg, Wien (1894).
- 69) WILCOX, M. E., H. WYLER, T. J. MABRY und A. S. DREIDING: Die Struktur des Betanins. 7. Mitteilung. Über die Konstitution des Randfarbstoffes Betanin, *Helv. Chim. Acta*, 48, 252-258 (1965).
- 70) WYLER, H. und J. CHIOVINI: Die Synthese

- von Cyclodopa (Leucodopachrom), *Helv. Chim. Acta*, **51**, 1476-1494 (1968).
- 71) WYLER, H. und A. S. DREIDING: Kristallisiertes Betanin, Vorläufige Mitteilung, *Helv. Chim. Acta*, **40**, 191-192 (1957).
- 72) WYLER, H. und A. S. DREIDING: Darstellung und Abbauprodukte des Betanins, 3. (Vorläufige Mitteilung). Über die Konstitution des Randenfärbstoffes Betanin, *Helv. Chim. Acta*, **42**, 1699-1702 (1959).
- 73) WYLER, H. und A. S. DREIDING: Phytolaccanin, Der Farbstoff der Kermesbeere (*Phytolacca decandra* L.), 1. Mitteilung, Zur Kenntnis der Betacyane, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 249-257 (1961).
- 74) WYLER, H. und A. S. DREIDING: Abbauprodukte des Betanidins. 4. Mitteilung. Über die Konstitution des Randenfärbstoffes Betanin, *Helv. Chim. Acta*, **45**, 638-640 (1962).
- 75) WYLER, H., T. J. MABRY und A. S. DREIDING: Zur Struktur des Betanidins, 6. (Vorläufige) Mitteilung. Über die Konstitution des Randenfärbstoffes Betanin, *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1745-1748 (1963).
- 76) WYLER, H., H. RÖSLER, M. MERCIER und A. S. DREIDING: Präbetanin, ein Schwefelsäurehalbester des Betanins. Ein Beitrag zur Kenntnis der Betacyane, *Helv. Chim. Acta*, **50**, 545-561 (1967).
- 77) WYLER, H., G. VINCENTI, M. MERCIER, G. SASSU und A. S. DREIDING: Zur Konstitution des Randenfärbstoffes Betanin, 2. (Vorläufige) Mitteilung, *Helv. Chim. Acta*, **42**, 1696-1698 (1959).
- 78) WYLER, H., M. E. WILCOX und A. S. DREIDING: Umwandlung eines Betacyanins in ein Betaxanthin Synthese von Indicaxanthin aus Betanin, *Helv. Chem. Acta*, **48**, 361-366 (1965).
- 79) ZELLNER, J. and E. ZIKMUNDA: Chemistry of the Halophytes. II., *Monatsh.*, **56**, 197-199 (1930); *C. A.*, **25**, 3032 (1931).
- 80) ZINKE, TH. und W. WÜRKER: Über die Einwirkung sekundärer aromatischer Amine auf Dinitrophenylpyridiniumchlorid, *Liebig's Ann. Chem.*, **338**, 107-140 (1905).
- 81) BADGETT, B., I. PARIKH und A. S. DREIDING: Totalsynthese eines Neobetamidin-Derivates und des Neobetenamins, *Helv. Chim. Acta*, **53**, 433-448 (1970).

Summary

This paper is chiefly concerned with the isolation, crystallization, and elucidation of the chemical structure of a violet red pigment contained in leafy stems of *Salicornia europaea* L.. In the studies, it has been further investigated whether or not the *Salicornia* pigment is applicable to coloring of foodstuffs. Prior to the structural determination of the *Salicornia* pigment, a qualitative survey of the pigments of betalain series was carried out by using Centrospermae plants available in Hokkaido Prefecture. The chemical identification of an orange pigment, isolated from the yellow petals of *Portulaca grandiflora* HOOK., has been also made.

I. Survey of Betalain Pigments in Centrospermae Plants Growing in Hokkaido

In general, the pigments designated as betalains consist of two groups of nitrogenous pigments, violet red betacyanins and orange yellow betaxanthins. In this survey, occurrence of the betalain pigments has been examined in ten varieties of Centrospermae plants naturally growing or cultivated in Hokkaido (Chenopodiaceae, three spp., Amaranthaceae, four spp., Nyctaginaceae, one sp., and Portulacaceae, two spp.; Species and cultivars, total 22).

The crude pigments extracted from each of the plants were qualitatively analyzed by paper chromatography, paper electrophoresis, visible and ultraviolet spectroscopy, and discriminating reaction analyses between betacyanins and anthocyanins or between betaxanthins and flavonols.

From the experimental results obtained, it was concluded that all of the violet red pigments in the tested plants are betacyanins and that almost all the yellow or orange yellow pigments belong to betaxanthins.

Further, the following betacyanins were qualitatively estimated to be present: Betanin (or its isomer) in two cult. var. of *Beta vulgaris* var. *rubra* L., one sp. of *Mirabilis jalapa* L., and four cult. var. of *Portulaca grandiflora* HOOK.; amarantin (or its isomer) in one sp. of *Chenopodium album* L., one sp. of *Salicornia europaea* L., three cult. var. of *Amaranthus tricolor* L., three cult. var. of *Celosia cristata* L., one cult. var. of *Celosia plumosa* L., and one cult. var. of *Gomphrena globosa* L.; celosianin

(or its isomer) in three cult. var. of *Celosia cristata* L., and one cult. var. of *Celosia plumosa* L.; one of gomphrenins in one cult. var. of *Gomphrena globosa* L.; oleracin-I and -II in one sp. of *Portulaca oleracea* L.; and mesembryanthemin-II and -III in three cult. var. of *Portulaca grandiflora* HOOK..

Occurrence of the following betaxanthins in the tested plants was also qualitatively estimated: Vulgaxanthin in four cult. var. of *Beta vulgaris* var. *rubra* L., and indicaxanthin in two cult. var. of *Portulaca grandiflora* HOOK..

II. Isolation and Structural Determination of Violet Red Pigment of *Salicornia europaea* L.

(1) Isolation of Pigments

Leafy stems of *Salicornia europaea* L. (30 kg, fresh weight, per each run), harvested at the lake-side salt marsh of Notoro, Abashiri-shi, Hokkaido, were macerated and extracted with 0.1% hydrochloric acid solution (pH 2). The extract was chromatographed on an Amberlite IR-120 (H⁺-type) column and then on a Dowex 50 W-X 2 (H⁺-type) column to obtain effluents containing red pigments. Sephadex G-25 column chromatography of the concentrated effluents gave a reddish violet fraction, which, after concentration, was applied to a polyamide column and eluted with 5% citric acid solution (pH 2.4). Thus, three fractions, containing violet red, yellow, and orange yellow pigments, respectively, were afforded. The major violet red fraction was placed onto a Dowex 50 W-X 2 (H⁺-type) column, washed with 0.1% hydrochloric acid solution, and eluted with water. After the aqueous effluent was concentrated, crude crystals were obtained. Re-crystallization of the crystals from water gave violet red fine needles (200 mg, yield 0.00067%, m. p. 190°C). The yellow and orange pigments were not able to be investigated in detail owing to their very small amounts.

The isolated *Salicornia* pigment was found to be one of the betacyanin pigments by the discrimination tests between betacyanins and anthocyanins. The pigment showed absorption maxima in ultraviolet spectra, λ_{\max} 538, 270, and 295-300 (shoulder) m μ , characteristic to the betacyanin pigments and gave the well known infrared absorptions generally observed in the betacyanins, 3420, 3300, 2900, 1720,

1623, 1504 cm⁻¹, and so on. Although the isolated pigment was estimated to be an analogue to amarantin or iresinin-I from the elementary analysis (as hydrochloric acid salt, C 47.82%, H 4.96%, N 3.24%, Cl 4.60%), attempts to clarify the chemical structure of the pigment by nuclear magnetic resonance spectroscopy were unsuccessful owing to complexity of its spectral patterns.

However, it was deduced from the foregoing experimental results that the pigment, isolated for the first time in crystal form from *Salicornia europaea* L., is one of the betacyanins and also its possible structure is that of amarantin, iresinin-I, or related pigment.

The *Salicornia* pigment was subjected to partial hydrolysis in 1N hydrochloric acid. The resulted hydrolyzates were examined by paper chromatography and paper electrophoresis, and three reddish violet spots, corresponding to unhydrolyzed pigment, betanin (betanidin-5-O- β -D-glucopyranoside), and betanidin, respectively, were detected. The unhydrolyzed pigment was paper-chromatographically estimated to be a compound of larger molecular size than that of betanin. Consequently, it is obvious that one molecule of glucose is directly bonded to betanidin, aglycone of the *Salicornia* pigment, and it links further to one or more of the other sugar or the other group.

(2) Structural Determination of Aglycone Moiety

The *Salicornia* pigment (655 mg) was acid-hydrolyzed to obtain violet needles (80 mg, hydrochloride) as aglycone, from whose elementary analysis, ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy, and nuclear magnetic resonance spectroscopy, the aglycone was identified to be betanidin.

Although nuclear magnetic resonance pattern of the aglycone was rather simpler than that of the original pigment glycoside and permitted the observation of some major chemical shifts compatible with those of betanidin already reported in the literatures, the pattern was still more complex to be able to carry out satisfactory nuclear magnetic resonance analyses. Therefore, nuclear magnetic resonance analyses of the neo-compounds resulting from methylation of the aglycone hydrochloride were attempted.

The aglycone hydrochloride was dissolved in methanol and methylated in ethereal diazomethane

solution. The yellowish orange methylated compound was column-chromatographed over alumina to obtain a pure neo-compound as orange yellow needles (yield 25% per starting material, m. p. 253.3–254.0°C). The m. p., analytical values, ultraviolet and infrared-absorptions of the neo-compound thus obtained were identical with those of 5,6-di-O-methylneobetanidin trimethyl ester, respectively. The latter neo-compound had been separately prepared from red-beet betanin. In mass-spectrometric analyses of the former neo-compound, the parent peak (M^+ , m/e 456) was detectable and the fission pathway of almost all the major fragments was reasonably interpreted, and also in nuclear magnetic resonance spectroscopy, each of the signals was so distinct that they could be completely assigned to the protons of the compound.

On the other hand, as reference substances for the structural analyses of the compound by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, O,O,N-triacetyl cyclodopa methyl ester, 4-chloro-pyridine-2, 6-dicarboxylic acid dimethyl ester, and (2, 6-dicarboxy-4-pyridyl) malonic acid tetramethyl ester were synthesized and their properties were investigated in detail.

From the experimental results, the aglycone of the violet red *Salicornia* pigment was identified to be betanidin, and the pigment itself was estimated to be a glycoside, in which its sugar moiety links to either of the two hydroxyl pergroups in the aglycone.

(3) Structural Determination of Sugar Moiety

To study the sugar moiety of the *Salicornia* pigment, products of acid-hydrolysis of the pigment was tested for sugars by paper chromatography, paper electrophoresis, and two dimensional paper chromatography-electrophoretic analysis. Four aniline-phthalate positive spots were detected and identified as unchanged sugar, glucose, glucuronic acid, and glucuronolactone, respectively. The unchanged sugar on the paper chromatogram was eluted with water and allowed to hydrolyze in acid once more. The hydrolyzate gave three spots corresponding to glucose, glucuronic acid, and glucuronolactone by paper chromatography.

In this manner, the sugar moiety of the *Salicornia* pigment was estimated to be a disaccharide consisted of glucose and glucuronic acid. Isolation of the disaccharide was made in the following

way: The pigment crystals (1.8 g) were carefully degraded with hydrogen peroxide and the resulted products were purified by charcoal-Celite column chromatography and then by preparative paper chromatography. After the re-purification on a column packed with a mixture of Amberlite IR-120 (H^+ -type) and Amberlite IR-45 (OH^- -type) (1:1), the disaccharide was isolated in the form of white powder (19 mg). The powdery disaccharide was subjected to acid-catalyzed hydrolysis. Paper-chromatographic investigation of the hydrolyzate revealed the presence of glucose, glucuronic acid, and glucuronolactone. In enzymatic hydrolysis of the disaccharide, β -D-glucuronidase gave glucose and glucuronic acid in a molar ratio 1:1, but β -D-glucosidase did not produce any of the cleavage products.

From these results, it was concluded that the sugar moiety of the pigment is not β -D-glucosyl-D-glucuronic acid but β -D-glucuronyl-D-glucose, which is a member of aldobiouronic acid series.

The disaccharide was methylated by the HAKOMORI's method and then methanolized to give methylated compounds. That the methylated compounds are a mixture of methyl (methyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucopyranosyl)-uronate and methyl (3,4,6-tri-O-methyl)-D-glucopyranoside, was gas-liquid-chromatographically confirmed.

In the other experiment, the disaccharide was successively submitted to methylation, reduction with lithium-aluminum hydride, re-methylation, and methanolysis. The resulted methylated compounds were evidenced to be a mixture of methyl (2,3,4,6-tetra-O-methyl)-D-glucopyranoside and methyl (3,4,6-tri-O-methyl)-D-glucopyranoside by gas liquid chromatography.

From the findings thus obtained, it was elucidated that the sugar moiety disaccharide is composed of glucose and glucuronic acid and that the linkage between both of the constituent monosaccharides locates at C-2 position of the former sugar and C-1 position of the latter one.

Additional evidences for the identification were obtained by comparative mass-spectrometric and nuclear magnetic resonance analyses of the methylated or acetylated products of the disaccharide and synthesized sophorobiouronic acid as a reference substance.

Thus, it was definitely established that the disac-

charide, sugar moiety of the pigment glycoside, is sophorobiouronic acid [2-O-(β -D-glucopyranosyl uronic acid)-D-glucopyranose.

(4) Determination of Binding Position of Aglycone and Sugar Moieties

Paper-chromatographic investigations showed that the products obtained by emulsin (β -D-glucosidase) catalyzed hydrolysis of the *Salicornia* pigment are betanidin (as faint spot) and unchanged pigment (as distinct one). Hydrolysis with β -D-glucuronidase resulted betanin (betanidin-5-O- β -D-glucopyranoside) (as deep reddish violet spot) and unchanged pigment (as faint one), whereas use of both of the enzymes yielded betanin (as deep reddish violet spot), betanidin (as deep reddish violet one), and unchanged pigment (as faint one).

From these enzymatic reactions, the reducing end of the sugar moiety was clarified to be linked to the aglycone in a fashion of β -bonding.

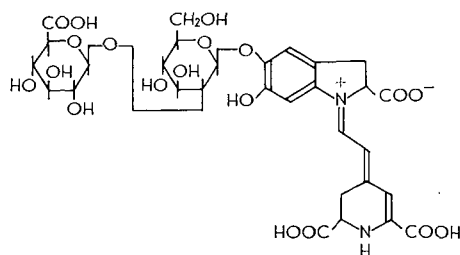
To determine binding position between the aglycone and the sugar moieties, the following experiment was conducted: After the *Salicornia* pigment crystals (600 mg) were methylated with diazomethane, the resultants were purified by passing over an alumina column to yield orange yellow oil (ca. 75 mg). The oil was decomposed with potassium hydroxide, followed by oxidation with the FREMY's salt. The products were chromatographed on a silica gel column and pale yellow fine granular substance (6 mg, m.p. 168°C) was obtained.

Physical and chemical properties of the granular substance were compared with those of synthesized 5-hydroxy-6-methoxy-indole-2-carboxylic acid methyl ester. The excellent agreement was given in analytical values, m.p.'s, and absorptions or peaks observed in ultraviolet-, infrared-, mass-, and nuclear magnetic resonance-spectra between the two substances.

From the results obtained, it was ascertained that the indole part of the aglycone is 5-hydroxy-6-methoxy-indole-2-carboxylic acid methyl ester and that the sugar moiety links to a hydroxyl group situated at C-5 position of the aglycone.

(5) Final Determination of Chemical Structure of *Salicornia* Pigment

On the basis of all of the experimental results, the chemical structure of the violet red pigment of *Salicornia europaea* L. was definitely established



Chemical Structure of *Salicornia* Pigment
Betanidin-5-O-[2-O-(β -D-glucopyranosyl uronic acid)]- β -D-glucopyranoside

to be betanidin-5-O-[2-O-(β -D-glucopyranosyl uronic acid)]- β -D-glucopyranoside.

The pigment with this structure, called amarantin, has already been isolated from the leaves of *Amaranthus tricolor* L.. However, attempts of isolation, crystallization, and structural determination of the pigment in *Salicornia europaea* L. have never been reported in the literatures.

III. Investigation on Violet Red *Salicornia* Pigment as Coloring Matter for Foods

Stability of the *Salicornia* pigment has been investigated from the viewpoint of its versatility as coloring matter for foods.

The pigment is stable under -20°C and unstable at 4°C to room temperature; and it is comparatively stable at pH 4-5 but it unstabilizes rapidly at the other pH's. Addition of ascorbic acid to the extent of 0.1% or of cysteine to the extent of 1% to the pigment solution (pH 3-5) is ineffective to prevent decolorization of the pigment. The pigment is quite labile in ethanol.

Consequently, from the experimental evidences so far obtained, the *Salicornia* pigment was proved to be unsatisfactory as a stable violet red coloring matter for foodstuffs.

Although an orange neo-betanidin derivative obtained by conversion of the violet red pigment was rather stable for coloring, it is of course unable to use for the purpose of violet red coloring.

IV. Isolation and Structural Determination of Yellow Pigment of *Portulaca grandiflora* HOOK.

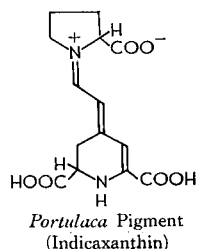
Yellow petals of *Portulaca grandiflora* HOOK. (collected at Experimental Farms of Hokkaido University and "Sapporo-Saishu-En", 1 kg) was ex-

tracted with methanol. The methanol extract, after adjusted to pH 3 was centrifuged. The supernatant was chromatographed on a Dowex 50 W-X 2 (H⁺-type) column, and the resulted aqueous eluate was, after concentration, applied to a polyimide column. Yellowish orange fraction obtained by elution with 0.1% hydrochloric acid solution was treated with ion-exchange resins and concentrated. The concentrate was loaded onto a cellulose column and chromatographed by eluting with methanol. An orange powdery pigment was obtained from the eluate (14 mg; m. p., indefinite, darkened and decomposed).

Elementary analysis of the isolated pigment gave an empirical formula corresponding to indicaxanthin, one of betaxanthins (C₁₄H₁₆N₂O₆). The pigment showed the ultraviolet absorptions (λ_{\max} 484-485 m μ) characteristic to the pigments of betaxanthin series. The major infrared absorptions of the pigment were undistinguishable from those of two betaxanthins obtained by converting syntheses with betanin and L-proline or with betanin and L-hydroxyproline. Although, in paper-chromatographic and paper-electrophoretic examinations, all of these three pigments gave almost identical R_f-values,

the *Portulaca* pigment exhibited a spot corresponding to the synthesized pigment from betanin and L-proline on silica gel thin layer chromatogram. Also, an amino acid produced by hydrochloric acid-hydrolysis of the *Portulaca* pigment was paper-chromatographically identified to be L-proline.

From the results described above, it was confirmed that the *Portulaca* pigment was indicaxanthin, one of betaxanthin analogues.



Indicaxanthin has already been isolated from the matured orange yellow fruits of *Opuntia ficus-indica* MILL. and its chemical structure has also been elucidated. Up to the present, however, isolation of the pigment from *Portulaca grandiflora* HOOK. has not been reported.