

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-126810

(P2009-126810A)

(43) 公開日 平成21年6月11日(2009.6.11)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
<b>C07H</b>	<b>17/065</b>	<b>(2006.01)</b>	C07H	17/065	CSP	4C057
<b>A61K</b>	<b>36/18</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K	35/78	C	4C086
<b>A61K</b>	<b>31/7048</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K	31/7048		4C088
<b>A61P</b>	<b>39/06</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P	39/06		
<b>A61P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P	35/00		

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 50 頁)

(21) 出願番号 特願2007-302353 (P2007-302353)  
 (22) 出願日 平成19年11月22日(2007.11.22)

(71) 出願人 504258527  
 国立大学法人 鹿児島大学  
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100101904  
 弁理士 島村 直己  
 (72) 発明者 橋本 文雄  
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号  
 国立大学法人鹿児島大学内

最終頁に続く

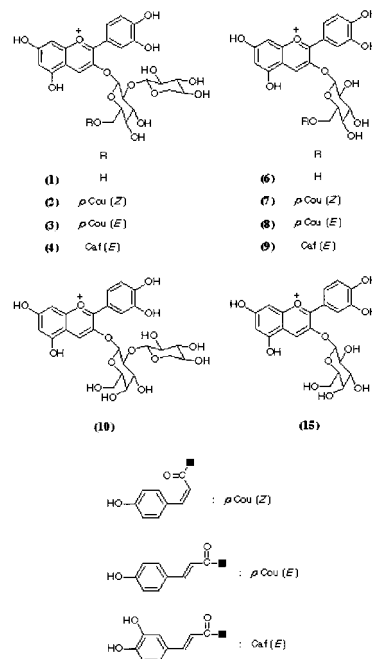
(54) 【発明の名称】 ツバキ由来のアントシアニン色素、その製造方法及び用途、並びにツバキの品種識別方法

(57) 【要約】

【課題】ツバキの花又は花弁の抽出物から、赤色を発現するアントシアニン色素を分離する方法、また、分離された色素の化学構造を知ることによって、ツバキ品種間での色素分布の違いを知る方法を提供する。

【解決手段】本発明は、ツバキの花又は花弁の抽出物から、新規アントシアニン色素を含む種々のアントシアニン色素を得る方法、及び当該得られたアントシアニン色素を標品として、高速液体クロマトグラフィー分析を行うことによって、ツバキを種類分けする方法に関する。

【選択図】図1

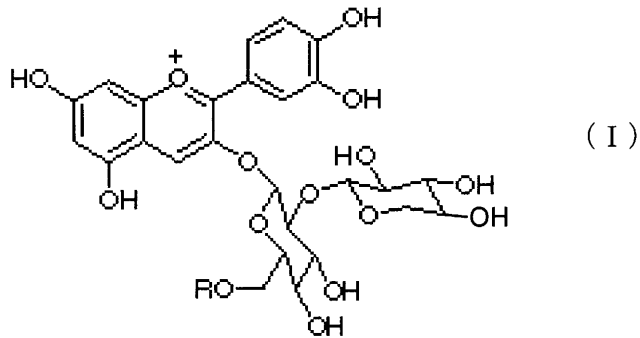


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次式 (I)

## 【化 1】



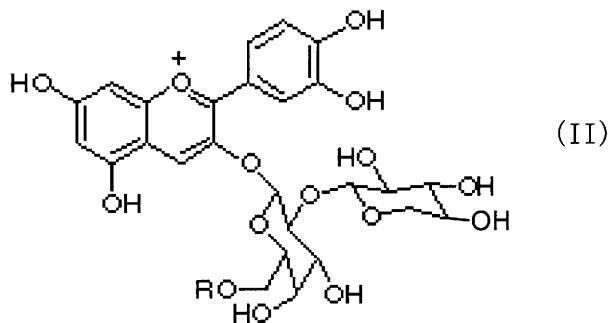
10

(式中、R はアセチル基を表す。)  
で示される化合物。

## 【請求項 2】

次式 (II)

## 【化 2】



20

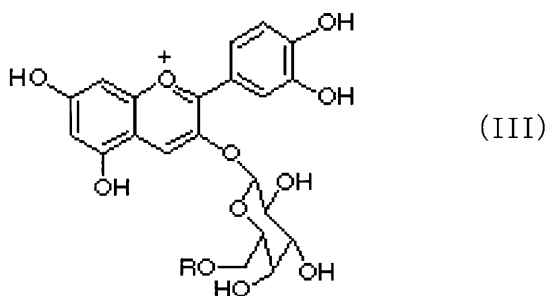
(式中、R は (Z) - p - クマロイル基、(E) - p - クマロイル基、(E) - カフェオイル基又はアセチル基を表す。)  
で示される化合物。

30

## 【請求項 3】

次式 (III)

## 【化 3】



40

(式中、R は (Z) - p - クマロイル基、(E) - p - クマロイル基又は (E) - カフェオイル基を表す。)  
で示される化合物。

## 【請求項 4】

ツバキの花又は花卉の抽出物から請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の化合物を単離及

50

び精製することを特徴とするアントシアニン色素の製造方法。

【請求項 5】

前記ツバキがトウツバキ (*Camellia reticulata* Lindl.) であり、アントシアニン色素が cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside 又は cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside である請求項 4 記載の製造方法。

【請求項 6】

前記ツバキがホンコンツバキ (*Camellia hongkongensis* Sem.) であり、アントシアニン色素が cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galactopyranoside、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyranoside 又は delphinidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside である請求項 4 記載の製造方法。

【請求項 7】

前記ツバキがサルウィンツバキ (*Camellia saluenensis* Stapf ex Bean) であり、アントシアニン色素が cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside 又は cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside)-5-glucopyranoside である請求項 4 記載の製造方法。

【請求項 8】

前記ツバキが園芸品種のツバキ：大理茶 (*Dalicha*) であり、アントシアニン色素が cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-acetyl)-glucopyranoside、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galactopyranoside、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyranoside 又は cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-acetyl)-galactopyranoside である請求項 4 記載の製造方法。

【請求項 9】

前記単離及び精製手段がカラムクロマトグラフィーである請求項 4～8 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 10】

抽出溶媒が酢酸-メタノール混合溶媒である請求項 4～9 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 11】

ツバキの花又は花卉の抽出物中に含まれるアントシアニン色素の組成を分析することを特徴とするツバキの品種識別方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 2】

高速液体クロマトグラフィー法によりアントシアニン色素の組成を分析する請求項 1 1 記載のツバキの品種識別方法。

## 【請求項 1 3】

高速液体クロマトグラフィー法を、リン酸水溶液と、リン酸 - ギ酸 - アセトニトリル - テトラヒドロフラン - 水混合溶媒とを用いてリニア - グラジエント溶出させることにより行う請求項 1 2 記載のツバキの品種識別方法。

## 【請求項 1 4】

ツバキの花又は花弁の抽出物又はその精製物を含有する抗酸化剤。

## 【請求項 1 5】

ツバキの花又は花弁の抽出物の精製物が単離・精製されたアントシアニン色素である請求項 1 4 記載の抗酸化剤。

10

## 【請求項 1 6】

ツバキの花又は花弁の抽出物又はその精製物を含有する抗癌剤。

## 【請求項 1 7】

ツバキの花又は花弁の抽出物の精製物が単離・精製されたアントシアニン色素である請求項 1 6 記載の抗癌剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アントシアニン色素、その製造方法及び用途、並びにツバキの品種識別方法に関する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

ツバキは、観賞用花木として世界的に親しまれているのみならず、種子を椿油の原料として用い、また、花は開花直前に採集して日干ししたものを、腸出血の救急薬や、滋養・強壮のため煎じて服用され、常用すれば美容上にも好ましいなど、民間薬として用いられている（非特許文献 1）。

## 【0003】

紅色ツバキにはその花色を発現する色素として、アントシアニン色素が含まれていることが報告されている。1953年に林らは紅色ツバキより初めてアントシアニン色素を単離し、その化学構造を cyanidin 3-O- - glucopyranoside (6) であることを明らかにした（非特許文献 2）。また、斉藤らはカンツバキ、ヤブツバキ、山茶花の紅花から cyanidin 3-O- (6-O- (E) - p-coumaroyl) - - glucopyranoside (8) を単離し（非特許文献 3）、寺原らは、紅花茶の葉から cyanidin 3-O- - galactopyranoside (15)、delphinidin 3-O- - galactopyranoside、delphinidin 3-O- (6-O- (E) - p-coumaroyl) - - galactopyranoside を単離した報告がある（非特許文献 4）。

30

## 【0004】

本発明者の一人である坂田は、1988年その学位論文の中で薄層クロマトグラフによりツバキ花弁中に 15 種類のアントシアニン色素が存在することを明らかにしている（非特許文献 5）。また、著書の中では、紅色ツバキの花弁には、cyanidin 3-O- - sophoroside、cyanidin 3,5-di-O- - glucoside が存在するとの記載がある（非特許文献 6）。更に、ヤブツバキ系の品種では、cyanidin 3-O- - glucoside の花弁中の含量が増せばより赤色になることや、トウツバキ系品種では、cyanidin 3-O- - sophoroside の花弁中の含量が増せばより赤色に変化することの記載がある。

40

## 【0005】

従来において、ツバキの花や植物体には以下のような活性又は利用方法があることが開

50

示されている。

【0006】

特許文献1には、ツバキ科ツバキ属植物、特に、ツバキ (*Camellia japonica*)、サザンカ (*Camellia sasanqua*) の抽出物がヒアルロニダーゼの活性阻害剤作用を有することが開示されている。

【0007】

特許文献2には、ツバキ科植物の根と茎を除く、該植物由来の、水及び有機溶媒にともに溶解性を示す抽出物がセラミド産生を促進することが開示されている。

【0008】

特許文献3には、ツバキの花から抽出されたフラボノイド成分を経口又は静注することによって、心臓病又は脳血管症の治療を可能とすることが開示されている。

10

【0009】

特許文献4には、ツバキの花など10種類の漢薬を配合した外用製剤が神経痛、頭痛などに有効であることが開示されている。

【0010】

特許文献5には、山茶花の抽出物などが美白効果と皮膚のメラニン色素合成を抑制することが開示されている。

【0011】

特許文献6には、クエン酸やリンゴ酸を添加することによって、ツバキの花から効率よく色素を抽出する方法が開示されている。

20

【0012】

特許文献7には、ツバキの花をローストすることによって、カカオ豆と同じ香り、色、味を出すことのできる粉末を製造する方法が開示されている。

【0013】

特許文献8には、ツバキの花を漬物として保存する製造方法が開示されている。

特許文献9には、ツバキの花を発酵させることによってツバキ茶を製造する方法が開示されている。

【0014】

【特許文献1】特開2003-012489号公報

【特許文献2】特開2004-189683号公報

30

【特許文献3】CN1775249号公報

【特許文献4】CN1279091号公報

【特許文献5】特開2000-302634号公報

【特許文献6】特開昭55-123655号公報

【特許文献7】特開昭55-111758号公報

【特許文献8】特開昭55-111751号公報

【特許文献9】特開昭55-099180号公報

【非特許文献1】主婦の友社、主婦の友生活シリーズ、「身近にあり、効きめの確かな「薬草カラー図鑑」」、1985年、p.29-30

【非特許文献2】Hayashi, K.とAbe, Y.「Studien über Anthocyane, XXIII」、資源科学研究所彙報 (Misc. Rep. Res. Inst. Natur. Resources)、1953年、第29巻、p.1-8

40

【非特許文献3】Saito, N., Yokoi, M., Yamaji, M. and Honda, T.「Cyanidin 3-p-coumaroylglucoside in *Camellia* species and cultivars」、Phytochemistry、1987年、第26巻(10号)、p.2761-2762

【非特許文献4】Terahara, N., Takeda, Y., Nesumi, A. and Honda, T.「Anthocyanins from red flower tea (*Benibana-cha*), *Camellia sinensis*」、Phytochemistry、2001年、第56巻、p.359-361

50

【非特許文献5】坂田祐介、学位論文「ツバキ属植物の花色素に関する研究」、1988年、p. 10 - 12

【非特許文献6】坂田祐介、植物色素研究会編、大阪公立大学共同出版会、植物色素研究法「ツバキの花色素と花色育種」、2004年、p. 191 - 206

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

前述したように、従来ではツバキの花又は花弁の抽出物の生物学的活性が明らかにされ、また、その利用方法が発明されたものの、ツバキの花又は花弁の抽出物に含まれる、赤色を発現するアントシアニン色素については不明な点が多く、それらの詳細な分離法、色素の詳細な化学構造、色素の品種間での分布の違いについては知られていなかった。これらの分離法が確立できれば、ツバキの花又は花弁の抽出物を更に有効に使用できるものと考えられる。

10

【0016】

そこで、本発明は、ツバキの花又は花弁の抽出物から、赤色を発現するアントシアニン色素を分離する方法、また、分離された色素の化学構造を知ることによって、ツバキ品種間での色素分布の違いを知る方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、ツバキ花弁の抽出物から25種類のアントシアニン色素、特に、8種類の新規アントシアニン色素を得ることに成功し、更に、得られたアントシアニンを標品として、高速液体クロマトグラフィー分析を行うことによって、各色素組成を元にツバキを種類分けすることが可能となり、ツバキ花弁由来のアントシアニンエキスを利用するために、明確に種類分けできることを見出し、本発明を完成するに至った。

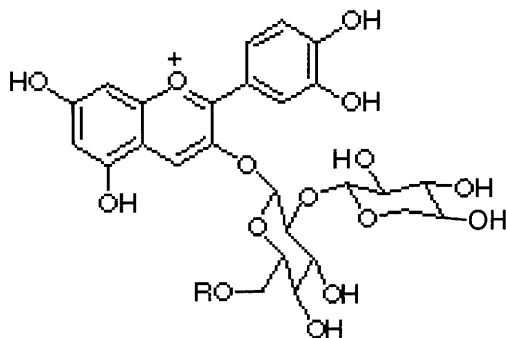
20

【0018】

本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) 次式(I)

【化1】



(I)

30

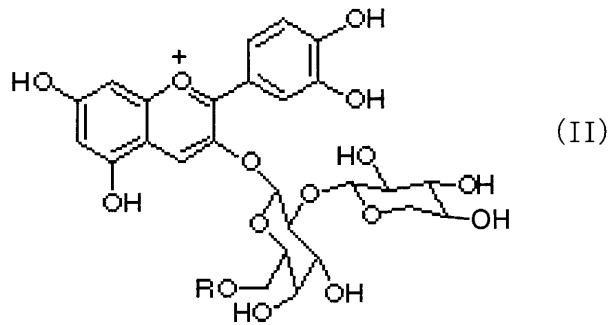
(式中、Rはアセチル基を表す。) 示される化合物。

40

【0019】

(2) 次式(II)

## 【化2】



10

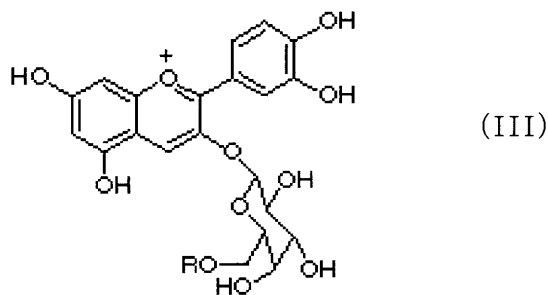
(式中、Rは(Z)-p-クマロイル基、(E)-p-クマロイル基、(E)-カフェオ  
イル基又はアセチル基を表す。)

で示される化合物。

## 【0020】

(3)次式(III)

## 【化3】



20

(式中、Rは(Z)-p-クマロイル基、(E)-p-クマロイル基又は(E)-カフェ  
オイル基を表す。)

で示される化合物。

30

## 【0021】

(4)ツバキの花又は花弁の抽出物から前記(1)~(3)のいずれかに記載の化合物を  
単離及び精製することを特徴とするアントシアニン色素の製造方法。

## 【0022】

(5)前記ツバキがトウツバキ(*Camellia reticulata* Lindl.)  
であり、アントシアニン色素がcyanidin 3-O-(2-O-xylo  
pyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopy  
ranoside(2)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyra  
nosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranosid  
e(4)又はcyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)  
-glucopyranoside(7)である前記(4)に記載の製造方法。

40

## 【0023】

(6)前記ツバキがホンコンツバキ(*Camellia hongkongensis*  
Seem.)であり、アントシアニン色素がcyanidin 3-O-(6-O-(Z)  
-p-coumaroyl)-glucopyranoside(7)、cyan  
idin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galacto  
pyranoside(16)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-c  
oumaroyl)-galactopyranoside(17)、cyanid  
in 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyran  
oside(18)又はdelphinidin 3-O-(6-O-(Z)-p-co

50

umaroyl) - - glucopyranoside (20)である前記(4)に記載の製造方法。

【0024】

(7)前記ツバキがサルウィンツバキ(Camellia saluenensis Stapf ex Bean)であり、アントシアニン色素がcyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)- - glucopyranoside(7)又はcyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)- - glucopyranoside)-5- - glucopyranoside(24)である前記(4)に記載の製造方法。

【0025】

(8)前記ツバキが園芸品種のツバキ：大理茶(Dalicha)であり、アントシアニン色素がcyanidin 3-O-(2-O- - xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)- - glucopyranoside(2)、cyanidin 3-O-(2-O- - xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)- - glucopyranoside(4)、cyanidin 3-O-(2-O- - xylopyranosyl-6-O-acetyl)- - glucopyranoside(5)、cyanidin 3-O-(2-O- - xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)- - galactopyranoside(11)、cyanidin 3-O-(2-O- - xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)- - galactopyranoside(12)、cyanidin 3-O-(2-O- - xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)- - galactopyranoside(13)又はcyanidin 3-O-(2-O- - xylopyranosyl-6-O-acetyl)- - galactopyranoside(14)である前記(4)に記載の製造方法。

【0026】

(9)前記単離及び精製手段がカラムクロマトグラフィーである前記(4)~(8)のいずれかに記載の製造方法。

(10)抽出溶媒が酢酸-メタノール混合溶媒である前記(4)~(9)のいずれかに記載の製造方法。

【0027】

(11)ツバキの花又は花弁の抽出物中に含まれるアントシアニン色素の組成を分析することを特徴とするツバキの品種識別方法。

(12)高速液体クロマトグラフィー法によりアントシアニン色素の組成を分析する前記(11)に記載のツバキの品種識別方法。

【0028】

(13)高速液体クロマトグラフィー法を、リン酸水溶液と、リン酸-ギ酸-アセトニトリル-テトラヒドロフラン-水混合溶媒とを用いてリニア-グラジエント溶出させることにより行う前記(12)に記載のツバキの品種識別方法。

(14)ツバキの花又は花弁の抽出物又はその精製物を含有する抗酸化剤。

【0029】

(15)ツバキの花又は花弁の抽出物の精製物が単離・精製されたアントシアニン色素である前記(14)に記載の抗酸化剤。

(16)ツバキの花又は花弁の抽出物又はその精製物を含有する抗癌剤。

(17)ツバキの花又は花弁の抽出物の精製物が単離・精製されたアントシアニン色素である前記(16)に記載の抗癌剤。

【発明の効果】

【0030】

本発明によれば、ツバキ抽出物からアントシアニン色素を得ることができ、また、得られたアントシアニン色素を標品として、高速液体クロマトグラフィー分析を行うことによ

10

20

30

40

50



って、各色素組成を元にツバキ属を種類分けすることが可能となり、ツバキ花卉由来のアントシアニンエキスを利用するために、明確に種類分けできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係るツバキの花又は花卉の抽出物（以下「ツバキ色素抽出物」という。）は、ツバキ、好ましくは紅花ツバキの花又は花を溶媒抽出に供することで得ることができる。例えば、ツバキの花又は花を、酢酸と低級アルコール（例えばメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、イソブタノール、好ましくはメタノール）の1～1.5対1、好ましくは1対1（容量比）で混合した溶媒を用いた抽出に供し、これを1回又は数回（例えば3回）繰り返すことでツバキ色素抽出物を得ることができる。

10

【0032】

通常、ツバキの花又は花1kg当り抽出溶媒3～4Lを使用する。抽出温度は、通常、溶媒の融点ないし溶媒の沸点の範囲内であり、好ましくは15～30℃、更に好ましくは20～25℃である。また、抽出は、通常常圧下で行うが、加圧下又は減圧下で行ってもよい。抽出時間は、抽出温度等により異なり、通常室温で1日～2日間である。なお、本発明においては、ツバキ色素抽出物とは、前記抽出方法で得られた抽出液もしくは各種溶媒抽出液、その希釈液、その濃縮液又はその乾燥粉末を意味する。

【0033】

また、本発明においては、前述したツバキ色素抽出物を濾過、遠心分離又は精製処理等の精製手段に供することで、当該抽出物から夾雑物を除去した精製物を用いることができる。精製手段としては、例えば、カラムクロマトグラフィー、順相又は逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過が挙げられるが、カラムクロマトグラフィーが特に好ましい。

20

【0034】

例えば、ツバキ色素の酢酸と低級アルコール抽出溶液を減圧蒸留装置でアルコールを蒸留除去後、濃縮された溶液を直接、逆相用のゲル（例えば、MCIGelCHP-20P（三菱化学）など）のオープンカラムクロマトグラフィーに付す。移動相にA液として5%酢酸水溶液、B液として5%酢酸のメタノール溶液を用い、A液とB液との比率を100：0から順次B液の含量を増加させ、例えば、70：30、30：70、0：100と変えて、クロマトグラフィーを行う。最後にC液として5%酢酸を含むアセトンを用い、A液とC液との比率を50：50にしてクロマトグラフィーを行う。A液とB液との比率が20：80で溶出する粗製分画物、並びにA液とB液との比率が40：60で溶出する粗製分画物並びにA液とB液との比率が70：30で溶出する粗製分画物には、本発明のアントシアニン色素が含有される。従って、これら粗製分画物は、ツバキ色素の粗精製物として好適に使用することができる。

30

【0035】

また、得られた前記ツバキ色素の粗精製物を更に逆相用のゲル（例えば、Sephadex LH-20（GE Healthcare Biosciences AB）など）のオープンカラムクロマトグラフィーに付す。移動相にA液として5%酢酸水溶液、B液として5%酢酸のメタノール溶液を用い、A液とB液との比率を100：0から順次B液の含量を増加させ、例えば、70：30、30：70、0：100と変えて、クロマトグラフィーを行う。最後にC液として5%酢酸を含むアセトンを用い、A液とC液との比率を50：50にしてクロマトグラフィーを行う。A液とB液との比率が100：0で溶出する粗製分画物並びにA液とB液との比率が50：50で溶出する粗製分画物には、本発明であるアントシアニン色素が含有される。従って、これら粗製分画物は、ツバキ色素の粗精製物として好適に使用することができる。

40

【0036】

更にまた、得られた前記ツバキ色素の粗精製物を逆相用のゲル（例えば、Chromatorex ODS（Fuji Silysia Chemical LTD）など）の

50

オープンカラムクロマトグラフィーに付す。移動相にA液として5%酢酸水溶液、B液として5%酢酸のメタノール溶液を用い、A液とB液との比率を100:0から順次B液の含量を増加させ、例えば、100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、0:100と変えて、クロマトグラフィーを行う。最後にC液として5%酢酸を含むアセトンを用い、A液とC液との比率を50:50にしてクロマトグラフィーを行う。この操作を繰り返し行うことによって、本発明であるアントシアニン色素を単離することができる。

【0037】

また、単離されたアントシアニン色素の純度を上げるために、例えば、Sephadex LH-20 (GE Healthcare Biosciences AB) などのオープンカラムクロマトグラフィーに付す。移動相にA液として5%酢酸水溶液、C液として5%酢酸を含むアセトンを用い、A液とC液との比率を0:100から順次A液の濃度を2%ずつ上げて、25:75までクロマトグラフィーを行う。この操作を行うことによって、本発明のアントシアニン色素の純度を上げることができる。

10

【0038】

前記単離されたアントシアニン色素及びツバキ色素の粗精製物に含まれるアントシアニン色素を簡単に分析する方法を以下に例示する。

【0039】

例えば、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) を用いることでアントシアニン色素を確認できる。HPLCの溶出溶媒としては、A液としてリン酸水溶液と、B液としてリン酸-ギ酸-アセトニトリル-テトラヒドロフラン-水混合溶媒を用い、リニア-グラジエント溶出 (例えば、流速を1分間に0.8ml、カラムの温度を40に保ち、検出波長を525nmに設定し、A液とB液との比率を82:18から30:70の比率で35分かけて溶出) させることで、本発明のアントシアニン類をよく検出することができる。

20

【0040】

また、例えば、薄層クロマトグラフィー (TLC; Thin Layer Chromatography) を用いることでアントシアニン色素を容易に確認できる。TLCの展開溶媒としては、例えば、A液としてベンゼン-ギ酸エチル-ギ酸の1:7:1の比率で混合した溶液と、B液としてギ酸エチル-ギ酸-水の3:1:1の比率で混合した溶液を用い、A液とB液との比率を4:1から1:1程度の比率で混合し、TLCを展開すると、本発明のアントシアニン類はよく検出することができる。

30

【0041】

以上のように説明したツバキ色素抽出物又は精製物、又は、これらより単離されたアントシアニン色素を分析できる。この結果、25種類のアントシアニン色素を検出することができる。これらのアントシアニン色素は、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl)-glucopyranoside (1)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (2)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (3)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside (4)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-acetyl)-glucopyranoside (5)、cyanidin 3-O-glucopyranoside (6)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (7)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (8)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside (9)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl

40

50

) - galactopyranoside (10)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl) - galactopyranoside (11)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl) - galactopyranoside (12)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl) - galactopyranoside (13)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-acetyl) - galactopyranoside (14)、cyanidin 3-O-galactopyranoside (15)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl) - galactopyranoside (16)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl) - galactopyranoside (17)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl) - galactopyranoside (18)、delphinidin 3-O-glucopyranoside (19)、delphinidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl) - glucopyranoside (20)、delphinidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl) - glucopyranoside (21)、delphinidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl) - glucopyranoside (22)、cyanidin 3,5-di-O-glucopyranoside (23)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl) - glucopyranoside) - 5-glucopyranoside (24)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl) - glucopyranoside) - 5-glucopyranoside (25)である。

【0042】

前記のアントシアニン色素のうち、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-acetyl) - glucopyranoside (5) (前記式(I)においてRがアセチル基である化合物)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl) - galactopyranoside (11) (前記式(II)においてRが(Z)-p-クマロイル基である化合物)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl) - galactopyranoside (12) (前記式(II)においてRが(E)-p-クマロイル基である化合物、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl) - galactopyranoside (13) (前記式(II)においてRが(E)-カフェオイル基である化合物)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-acetyl) - galactopyranoside (14) (前記式(II)においてRがアセチル基である化合物)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl) - galactopyranoside (16) (前記式(III)においてRが(Z)-p-クマロイル基である化合物)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl) - galactopyranoside (17) (前記式(III)においてRが(E)-p-クマロイル基である化合物)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl) - galactopyranoside (18) (前記式(III)においてRが(E)-カフェオイル基である化合物)は新規化合物である。

【0043】

なお、本明細書において、アントシアニン色素の化合物名の末尾に付した番号は、後述する実施例及び図面に記載の化合物に付した番号に対応する。

【0044】

10

20

30

40

50

前記ツバキとして、トウツバキ (*Camellia reticulata* Lindl.) を使用すれば、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl)-glucopyranoside (1)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (2)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (3)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside (4)、cyanidin 3-O-glucopyranoside (6)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (7)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (8)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside (9)、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl)-galactopyranoside (10)、cyanidin 3-O-galactopyranoside (15)、のアントシアニン色素を分析及び製造できる。

10

## 【0045】

前記ツバキとして、ホンコンツバキ (*Camellia hongkongensis* Seem.) を使用すれば、cyanidin 3-O-glucopyranoside (6)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (7)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (8)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside (9)、cyanidin 3-O-galactopyranoside (15)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galactopyranoside (16)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside (17)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyranoside (18)、delphinidin 3-O-glucopyranoside (19)、delphinidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (20)、delphinidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (21)、delphinidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside (22)、のアントシアニン色素を分析及び製造できる。これらのうち、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galactopyranoside (16)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside (17)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyranoside (18)

20

30

40

は新規化合物である。

## 【0046】

前記ツバキとして、サルウィンツバキ (*Camellia saluenensis* Stapf ex Bean) を使用すれば、cyanidin 3-O-glucopyranoside (6)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (7)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside (8)、cyanidin 3,5-di-O-glucopyranoside (23)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside ( )-5-glucopyranoside (

50

24)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl-glucopyranoside)-5-glucopyranoside(25)のアントシアニン色素を分析及び製造できる。

【0047】

前記ツバキとして、園芸品種のツバキ：大理茶(Dalicha)を使用すれば、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl)-glucopyranoside(1)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-glucopyranoside(2)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside(3)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-glucopyranoside(4)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-acetyl)-glucopyranoside(5)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl)-galactopyranoside(10)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(11)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(12)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyranoside(13)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-acetyl)-galactopyranoside(14)、のアントシアニン色素を分析及び製造できる。これらのうち、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-acetyl)-glucopyranoside(5)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(11)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(12)、cyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyranoside(13)又はcyanidin 3-O-(2-O-xylcopyranosyl-6-O-acetyl)-galactopyranoside(14)は新規化合物である。

10

20

30

【0048】

以上のように説明したツバキ色素抽出物又は精製物、又は、これらより単離されたアントシアニン色素を有効成分として用いることで、飲食品、医薬品、化粧品などを製造するために利用することができる。ツバキ色素抽出物又は精製物は、例えば、抗酸化剤、抗癌剤の有効成分として用いることができる。

【0049】

本発明のツバキ色素抽出物又は精製物、又は、これらより単離されたアントシアニン色素の有効量を、錠剤、カプセル、顆粒、ドリンク、ペットボトルなどの任意の形態に添加又は封入するか、あるいは任意の飲食品に添加することも可能である。

40

【0050】

飲食品には、例えば、菓子類、レトルト食品、ジュース類、お茶類、乳製品などが含まれるが、これらに限定されない。また、飲食品には、必要に応じて甘味剤、調味料、乳化剤、懸濁化剤、防腐剤などを添加してもよいし、あるいはビタミン類、栄養剤、免疫増強剤(例えば、プロポリスやきのこと抽出物など)などを添加してもよい。

【0051】

本発明に使用できるツバキ(Camelia属)野生種として、限定されるものではないが、好ましくは紅花ツバキ、例えば、セッコウベニバナユチャ(浙江紅花油茶、C.

50

chekiangoleosa)、カンツバキ(C. hiemalis)、ホンコンツバキ(香港紅山茶、C. hongkongensis)、ヤブツバキ(紅山茶、C. japonica)、テマリツバキ(桜花短柱茶、C. maliflora)、ピタルツバキ(西南山茶、C. pitardii)、ピタルツバキピタル種(西南山茶西南種、C. pitardii var. pitardii)、ピタルツバキ雲南種(西南山茶雲南種、C. pitardii var. yunnanica)、マイレイツバキ(C. mairei)、ポリオドンタ(宛田紅花油茶、C. polyodonta)、トウツバキ(てん山茶、C. reticulata)、ロシフロラ(玫瑰連芯茶、C. rosiflora)、ユキルバキ(雪椿、C. rusticana)、サルウインツバキ(怒江山茶、C. saluenensis)、サザンカ(山茶花、C. sasanqua)、セミセラータ(南山茶、C. semiserata)、ワビスケ(侘助、C. wabisuke)が挙げられる。

10

## 【0052】

本発明に使用できるツバキ(Camelia属)園芸品種として、限定されるものではないが、例えば、艶姿(えにし)、乙女(おとめ)、勘次郎(かんじろう)、皇玉(こうぎょく)、獅子頭(ししがしら)、昭和の栄(しょうわのさかえ)、緋乙女(ひおとめ)、日の出富士(ひのでふじ)、朝日鶴(あさひづる)、大空(おおぞら)、大錦(おおにしき)、桜月夜(さくらづくよ)、七福神(しちふくじん)、東雲(しののめ)、酒中花(しゅちゅうか)、大朱盃(たいしゅはい)、宝合(たからあわせ)、昼夜錦(ちゅうやにしき)、丁子車(ちょうじぐるま)、鳴海渦(なるみがた)、二重弁天(にじゅうべんてん)、肥後入日の海(ひごいりひのうみ)、三国紅(みくにこう)、和合神(わごうじん)、旭(あさひ)、梅ヶ香(うめがか)、笑顔(えがお)、凱旋(がいせん)、鎌倉絞(かまくらしぼり)、古金襴(こきんらん)、佐保姫(さほひめ)、三段花(さんだんか)、蜀紅錦(しょっこうにしき)、飛竜(ひりゅう)、曙(あけぼの)、岩根絞(いわねしぼり)、有楽(うらく)、蝦夷錦(えぞにしき)、王冠(おうかん)、大阿蘇(おおあそ)、沖の浪(おきのなみ)、長楽(おさらく)、春日野(かすがの)、玉之浦(たまのうら)、太郎庵(たろうあん)、釣簾(つりががり)、鶏の子(とりのこ)、白班孔雀(はくはんくじゃく)、羽衣(はごろも)、春の台(はるのうてな)、光源氏(ひかるげんじ)、アドルフ・オーデュソン(Adolph Audusson)、ベティー・シェフィールド・シュプリーム(Betty Sheffield Supreme)、カーターズ・サンバースト(Carter's Sunburst)、C.M.ハヴィー(C.M. Hovey)、コンテッサ・ラヴィニア・マギ(Contessa Lavinia Maggi)、ドーンズ・アーリー・ライト(Dawn's Early Light)、ドウピュタント(Debutante)、ギリョ・ヌッチオ(Guilio Nuccio)、クレイマーズ・シュプリーム(Kramer's Supreme)、マーガレット・デイヴィス・ピコティー(Margaret Davis Picotee)、マトティアナ(Mathotiana)、ミセス・D.W.デイヴィス(Mrs. D.W. Davis)、ミセス・D.W.デイヴィス・デスカンソ(Mrs. D.W. Davis Descanso)、アーチ・オブ・トライアンフ(Arch of Triumph)、仏陀(Buddha)、唐椿(Captain Rowes)、張家茶(Chang's Camellia)、チャイナ・レディー(China Lady)、大瑪瑙(Cornelian)、菊弁(Chrysanthemum Petal)、大桃紅(Great Peach Bloom)、ハワード・アスパー(Haward Asper)、ラスカ・ビューティー(Lasca Beauty)、ロウ・シノー(Lois Shinault)、シャルレアン(Charlean)、ドネイション(Donation)、ドリーム・ボート(Dream Boat)、E.G.ウォーターハウス(E.G. Waterhouse)、エルジー・ジュアリー(Elsie Jury)、J.C.ウィリアムズ(J.C. Williams)、ジュリア・ハミター(Julia Hamiter)、ベイビー・ベアー(Baby Bear)、センティッド・ジェム(Scented Gem)、スニパト(Snipet)、タイニー・プリンセス(Ti

20

30

40

50

ny Princess)、ウァーリング・プリンセス(Wirlinga Princess)が挙げられる。

【0053】

なお、これらのツバキのアントシアニン色素を分析し、新規色素として、cyanidin 3-O-(2-O--xylopyranosyl-6-O-acetyl)-glucopyranoside(5)、cyanidin 3-O-(2-O--xylopyranosyl-6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(11)、cyanidin 3-O-(2-O--xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(12)、cyanidin 3-O-(2-O--xylopyranosyl-6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyranoside(13)、cyanidin 3-O-(2-O--xylopyranosyl-6-O-acetyl)-galactopyranoside(14)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(16)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(17)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-galactopyranoside(18)を単離及び精製することも、本発明に含まれる。

10

【実施例】

【0054】

20

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されないものとする。

【0055】

〔実施例1〕トウツバキ(C. reticulata Lindl.)の分析

(1) 花弁から色素の抽出と単離、精製の方法

トウツバキから花弁を採集した。採集した花弁は、褐変を防ぐため熱湯に3~5秒間浸漬し、ポリフェノールオキシダーゼなどの酵素を死活させた。浸漬後、花弁を室温で乾燥させた。乾燥花弁2kgに、酢酸とメタノールを1対1で混合した溶液(50%酢酸-メタノール)12Lを加え、20~25℃でアントシアニン色素を抽出した。抽出液を綿栓でろ過した後、溶媒を減圧下、ロータリーエバポレーターで留去した。抽出残渣を5%酢酸水溶液に溶解し、オープンカラムクロマトグラフィーに付した。オープンカラムクロマトグラフィーの条件は、固定相にエムシーアイゲルCHP-20P(MCI gel CHP-20P、三菱化学株式会社、Mitsubishi Chemical Corporation)、セファデックスLH-20(Sephadex LH-20、GE Healthcare Biosciences AB)、クロマトレックスODS(Chromatorex ODS、富士シリシア化学株式会社、Fuji Silysia Chemical LTD.)を用い、移動相にA液として5%酢酸水溶液、B液として5%酢酸-メタノールを用い、A液からB液の含量を10%ずつ増やすことによって、MCIgelのカラム(以下MCIカラム)-Sephadex LH-20カラム-ODSカラムの順番で各種クロマトグラフィーを行った。また、固定相にセファデックスLH-20(Sephadex LH-20、GE Healthcare Biosciences AB)を用い、移動相にA液として5%酢酸水溶液、C液として5%酢酸-アセトン(アセトンに酢酸を5%量加えたもの)を用い、C液からA液の含量を2%ずつ増やすことによってクロマトグラフィーを行った。最後に、Sephadex LH-20カラムとODSカラムを用い、移動相にA液として5%酢酸水溶液、B液として5%酢酸-メタノールを用い、A液からB液の含量を5%ずつ増やすことを繰り返した。

30

40

【0056】

これらのオープンカラムクロマトグラフィーを繰り返し行うことによって、アントシアニン色素として、cyanidin 3-O-(2-O--xylopyranosyl)-glucopyranoside(1)、cyanidin 3-O-(2-

50

O - - xylopyranosyl - 6 - O - ( Z ) - p - coumaroyl ) -  
 - glucopyranoside ( 2 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - -  
 xylopyranosyl - 6 - O - ( E ) - p - coumaroyl ) - - glu  
 copyranoside ( 3 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - xylo  
 pyranosyl - 6 - O - ( E ) - caffeoyl ) - - glucopyran  
 oside ( 4 )、cyanidin 3 - O - - glucopyranoside ( 6 )、  
 cyanidin 3 - O - ( 6 - O - ( Z ) - p - coumaroyl ) - -  
 glucopyranoside ( 7 )、cyanidin 3 - O - ( 6 - O - ( E )  
 - p - coumaroyl ) - - glucopyranoside ( 8 )、cyani  
 din 3 - O - ( 6 - O - ( E ) - caffeoyl ) - - glucopyrano  
 side ( 9 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - xylopyranosy  
 l ) - - galactopyranoside ( 10 )、cyanidin 3 - O -  
 - galactopyranoside ( 15 ) を単離及び精製した ( 図 1 ) 。

10

【 0 0 5 7 】

( 2 ) 色素の各種スペクトルデータ

単離・精製したアントシアニン色素のプロトン核磁気共鳴スペクトル ( <sup>1</sup> H - N u c l e a r m a g n e t i c r e s o n a n c e [ N M R ] s p e c t r u m ) を測定した。測定装置は、JNM-ECA600型核磁気共鳴装置 ( JEOL JNM-ECA600KS、日本電子データム株式会社、JEOL DATUM LTD. ) を用いた。測定は、CD<sub>3</sub>ODとCF<sub>3</sub>COODの9対1混合溶液を用いて行った。その結果を表1及び表2に示す。表中の数値はデルタ ( δ , ppm ) で示す。また、二番目に表された数値は、カップリング定数 ( J 値 ) を示している。表中の記号で、brは、broad、sはsinglet、dはdoublet、ddはdouble doublet、dddはdouble double doublet、tはtriplet、mはmultipletを示す。

20

【 0 0 5 8 】

【 表 1 】

Pigments	1	2	3	4	6
<b>Aglycone</b>					
Cyanidin					
4	8.80 s	8.57 s	8.81 s	8.82 s	8.93 s
6	6.59 s	6.54 br.s	6.49 d 1.9	6.52 d 1.8	6.63 s
8	6.78 s	6.60 br.s	6.78 d 1.9	6.79 d 1.8	6.82 s
2'	7.86 br.s	7.88 d 1.5	7.98 d 2.4	8.00 d 2.2	7.97 br.s
5'	6.89 d 8.9	6.99 d 8.7	6.99 d 8.7	7.00 d 8.7	6.95 d 8.9
6'	8.16 br.d 8.9	8.14 dd 8.7, 1.5	8.25 dd 8.7, 2.4	8.25 dd 8.7, 2.2	8.16 br.d 8.9
<b>Sugars</b>					
Glucose					
1"	5.43 d 7.5	5.50 d 7.5	5.49 d 7.5	5.49 d 7.5	5.31 d 7.5
2"	3.97 dd 8.9, 7.5	4.02 dd 8.9, 7.5	4.01 dd 8.9, 7.5	4.02 dd 8.7, 7.5	3.71 dd 8.9, 7.5
3"	3.84 dd 9.1, 8.9	3.87 dd 9.1, 8.9	3.84 dd 9.1, 8.9	3.83 dd 9.1, 8.7	3.60 dd 9.6, 8.9
4"	3.56 dd 9.4, 9.1	3.49 dd 9.6, 9.1	3.54 dd 9.7, 9.1	3.55 dd 9.6, 9.1	3.51 dd 9.6, 8.9
5"	3.64 br.dd 9.6, 5.3	3.92 ddd 9.6, 8.2, 2.0	3.90 ddd 9.7, 7.7, 2.2	3.89 ddd 9.6, 7.5, 2.2	3.61 ddd 8.9, 5.5, 2.0
6"a	3.99 dd 12.5, 2.0	4.49 dd 12.0, 2.0	4.52 dd 12.0, 2.2	4.53 dd 12.0, 2.2	3.96 dd 12.3, 2.0
6"b	3.81 dd 12.2, 5.3	4.41 dd 12.0, 8.2	4.37 dd 12.0, 7.7	4.39 dd 12.0, 7.5	3.77 dd 12.3, 5.5
Xylose					
1"	4.83 d 7.5	4.82 d 7.5	4.78 d 7.7	4.78 d 7.7	
2"	3.23 dd 9.1, 7.5	3.28 dd 9.1, 7.5	3.25 dd 9.1, 7.7	3.25 dd 9.2, 7.7	
3"	3.36 dd 9.1, 8.9	3.37 dd 9.1, 8.9	3.36 dd 9.1, 8.9	3.36 dd 9.2, 8.9	
4"	3.48 ddd 10.3, 8.9, 5.3	3.51 ddd 10.2, 8.9, 5.3	3.46 ddd 10.3, 8.9, 5.3	3.46 ddd 10.3, 8.9, 5.4	
5"a	3.78 dd 11.5, 5.3	3.83 dd 11.5, 5.3	3.78 dd 11.5, 5.3	3.76 dd 11.5, 5.4	
5"b	3.11 dd 11.5, 10.3	3.16 dd 11.5, 10.2	3.13 dd 11.5, 10.3	3.13 dd 11.5, 10.3	
<b>Acyl groups</b>					
		Z - p - coumaroyl	E - p - coumaroyl	E - caffeoyl	
2		7.29 d 8.7	7.25 d 8.6	6.88 br. s	
3		6.48 d 8.7	6.77 d 8.6		
5		6.48 d 8.7	6.77 d 8.6	6.75 m	
6		7.29 d 8.7	7.25 d 8.6	6.75 m	
α		5.70 d 12.9	6.20 d 15.9	6.15 d 15.9	
β		6.52 d 12.9	7.39 d 15.9	7.33 d 15.9	

30

40

br., broad; s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; m, multiplet.

50



【 0 0 5 9 】

【 表 2 】

Pigments	7	8	9	10	15
<b>Aglycone</b>					
Cyanidin					
4	8.73 <i>s</i>	8.89 <i>s</i>	8.74 <i>s</i>	8.80 <i>s</i>	8.96 <i>s</i>
6	6.62 <i>d</i> 1.9	6.53 <i>d</i> 2.0	6.50 <i>d</i> 1.8	6.58 <i>s</i>	6.62 <i>d</i> 2.0
8	6.69 <i>d</i> 1.9	6.81 <i>d</i> 2.0	6.66 <i>d</i> 1.8	6.80 <i>s</i>	6.84 <i>d</i> 2.0
2'	7.95 <i>d</i> 2.2	7.99 <i>d</i> 2.1	7.83 <i>d</i> 2.2	7.88 <i>br.s</i>	8.01 <i>d</i> 2.0
5'	6.99 <i>d</i> 8.7	7.00 <i>d</i> 8.9	6.87 <i>d</i> 8.8	6.90 <i>d</i> 8.6	6.97 <i>d</i> 8.9
6'	8.14 <i>dd</i> 8.7,2.2	8.23 <i>dd</i> 8.9,2.1	8.06 <i>dd</i> 8.8,2.2	8.16 <i>br.d</i> 8.6	8.20 <i>dd</i> 8.9,2.0
<b>Sugars</b>					
Glucose			Galactose		
1''	5.32 <i>d</i> 7.7	5.32 <i>d</i> 7.6	5.33 <i>d</i> 7.7	5.40 <i>d</i> 7.5	5.27 <i>d</i> 7.5
2''	3.73 <i>dd</i> 8.9,7.7	3.73 <i>dd</i> 8.9,7.6	3.74 <i>dd</i> 8.9,7.7	4.27 <i>dd</i> 9.1,7.5	4.01 <i>dd</i> 9.6,7.5
3''	3.61 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.60 <i>t</i> 8.9	3.66 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.98 <i>dd</i> 9.1,3.2	3.70 <i>dd</i> 9.6,3.4
4''	3.46 <i>dd</i> 9.5,9.1	3.49 <i>dd</i> 9.6,8.9	3.56 <i>dd</i> 9.6,9.1	4.02 <i>br.d</i> 3.2	3.97 <i>br.d</i> 3.4
5''	3.86 <i>ddd</i> 9.5,7.6,3.1	3.85 <i>ddd</i> 9.6,7.6,2.1	3.87 <i>ddd</i> 9.6,7.0,2.2	3.88 <i>br.dd</i> 8.2,3.2	3.83 <i>br.dd</i> 8.2,3.0
6''a	4.48 <i>dd</i> 12.0,3.1	4.52 <i>dd</i> 12.3,2.1	4.55 <i>dd</i> 12.0,2.2	3.86 <i>dd</i> 11.4,8.2	3.81 <i>dd</i> 11.3,8.2
6''b	4.46 <i>dd</i> 12.0,7.5	4.37 <i>dd</i> 12.3,7.6	4.39 <i>dd</i> 12.0,7.0	3.84 <i>dd</i> 11.4,2.9	3.78 <i>dd</i> 11.3,2.3
<b>Xylose</b>					
1'''				4.79 <i>d</i> 7.6	
2'''				3.23 <i>dd</i> 9.1,7.6	
3'''				3.36 <i>dd</i> 9.1,8.9	
4'''				3.46 <i>ddd</i> 10.2,8.9,5.3	
5'''a				3.72 <i>dd</i> 11.4,5.3	
5'''b				3.09 <i>dd</i> 11.4,10.2	
<b>Acyl groups</b>					
	<i>Z</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> -caffeoyl		
2	7.34 <i>d</i> 8.7	7.28 <i>d</i> 8.5	6.82 <i>br.s</i>		
3	6.53 <i>d</i> 8.7	6.78 <i>d</i> 8.5			
5	6.53 <i>d</i> 8.7	6.78 <i>d</i> 8.5	6.67 <i>m</i>		
6	7.34 <i>d</i> 8.7	7.28 <i>d</i> 8.5	6.67 <i>m</i>		
$\alpha$	5.73 <i>d</i> 12.8	6.21 <i>d</i> 15.8	6.14 <i>d</i> 15.8		
$\beta$	6.58 <i>d</i> 12.8	7.42 <i>d</i> 15.8	7.31 <i>d</i> 15.8		

br., broad; *s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, double doublet; *t*, triplet; *m*, multiplet.

10

20

【 0 0 6 0 】

単離・精製したアントシアニン色素の炭素13核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C}$ -Nuclear magnetic resonance [NMR] spectrum) を測定した。測定装置は、JNM-ECA600型核磁気共鳴装置 (JEOL JNM-ECA600KS、日本電子データム株式会社、JEOL DATUM LTD.) を用いた。測定は、 $\text{CD}_3\text{OD}$  と  $\text{CF}_3\text{COOD}$  の9対1混合溶液を用いて行った。その結果を表3に示す。表中の数値はデルタ ( $\delta$ , ppm) で示す。また表中、C (Z) はパラクマル酸のZ型、C (E) はパラクマル酸のE型、Caf (E) はカフェー酸のシグナルであることを示す。

30

【 0 0 6 1 】

【表 3】

Pigments	1	2	3	4	6	7	8	9	10	15
Aglycone										
Cyanidin										
2	163.4	163.2	164.2	164.2	163.8	163.8	164.4	163.5	163.5	164.0
3	145.2	144.8	144.8	144.9	145.6	145.3	145.1	145.0	145.2	145.6
4	135.6	134.5	136.1	136.2	136.6	135.8	136.8	136.4	135.5	136.7
5	159.2	159.1	159.2	159.2	159.3	159.3	159.1	159.2	159.1	159.4
6	103.3	103.4	103.7	103.8	103.5	103.5	103.7	103.8	103.5	103.3
7	170.4	170.3	170.5	170.7	170.6	170.6	170.7	170.7	170.3	170.4
8	95.1	95.1	95.2	95.2	95.2	95.3	95.3	95.4	95.2	95.1
9	157.2	157.0	157.5	157.6	157.6	157.5	157.6	157.4	157.2	157.6
10	113.1	113.0	113.1	113.2	113.4	113.4	113.3	113.2	113.1	113.2
1'	121.1	121.1	121.2	121.3	121.2	121.3	121.3	121.1	121.1	121.2
2'	118.3	118.5	118.9	118.9	118.4	118.5	118.5	118.2	118.2	118.4
3'	147.5	147.5	147.6	147.6	147.4	147.4	147.5	147.3	147.3	147.3
4'	155.9	155.9	155.9	155.9	155.8	155.9	155.9	155.7	155.8	155.8
5'	117.5	117.5	117.4	117.4	117.5	117.6	117.5	117.4	117.4	117.4
6'	128.9	128.8	128.8	128.8	128.3	128.3	128.4	128.3	128.9	128.2
Sugars										
Glucose					Galactose					
1"	101.4	100.2	100.9	101.1	103.7	102.8	103.1	103.1	101.8	104.3
2"	81.5	82.0	81.9	82.0	74.8	74.7	74.8	74.8	79.8	72.1
3"	78.7	78.0	77.9	77.9	78.8	78.0	77.9	77.9	75.2	74.9
4"	71.2	71.6	71.5	71.5	71.1	71.9	71.8	71.6	70.2	70.1
5"	78.3	76.0	76.0	76.1	78.2	76.1	76.1	76.1	77.8	77.8
6"	62.3	64.2	64.5	64.5	62.4	64.5	64.6	64.5	62.4	62.4
Xylose										
1'''	105.7	106.2	106.0	106.0					105.9	
2'''	75.8	75.9	75.7	75.8					75.9	
3'''	77.9	77.9	77.9	77.9					77.9	
4'''	71.1	71.0	71.1	71.1					71.0	
5'''	67.4	67.4	67.3	67.3					67.3	
Acyl groups										
		C(Z)	C(E)	Caf(E)		C(Z)	C(E)	Caf(E)		
1		127.2	126.9	127.6		127.3	127.0	127.6		
2		133.6	131.2	115.5		133.6	131.3	115.5		
3		115.7	116.9	149.7		115.8	116.9	149.5		
4		159.9	161.4	146.8		159.9	161.4	146.6		
5		115.7	116.9	116.6		115.8	116.9	116.5		
6		133.6	131.2	122.9		133.6	131.3	123.1		
α		115.8	114.6	114.7		115.9	114.7	114.7		
β		144.5	146.9	147.3		144.6	146.9	147.3		
C=O		168.2	169.0	169.1		168.4	169.1	169.2		

C(Z), *Z*-*p*-coumaroyl; C(E), *E*-*p*-coumaroyl; Caf(E), *E*-caffeoyl.

## 【0062】

図1で示した(1)~(4)、(6)~(10)及び(15)のアントシアニン色素の紫外外部吸収スペクトル(Ultra Violet spectrum)を測定した。測定には、島津製作所株式会社の分光機器(UV-visible recording spectrometer、UV-2100)を用いた。その結果は次の通りである。測定溶媒はメタノールである。shはshoulderを示す。

色素(1): 赤色無晶形粉末、UV-visible max MeOH (nm) (log

10

20

30

40

50

- ) : 282 (4.31), 379 (3.10), 538 (3.47);  
 0.01% HCl-MeOH: 282 (4.37), 332 (3.68),  
 530 (4.59); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.40), 312  
 (4.00), 411 (3.81), 564 (4.62)。
- 色素(2): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (log  
 ) : 284 (4.51), 311 sh (4.40), 553 (3.18  
 ); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.53), 314 (4.40  
 ), 530 (4.54); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.46), 3  
 13 (4.49), 570 (4.61)。
- 色素(3): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (log  
 ) : 284 (4.58), 311 sh (4.48), 553 (3.25  
 ); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.60), 314 (4.48  
 ), 530 (4.61); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.53), 3  
 13 (4.56), 570 (4.69)。
- 色素(4): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (log  
 ) : 285 (4.61), 331 (4.46), 532 (4.53);  
 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.65), 330 (4.50),  
 530 (4.69); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.48), 314  
 (4.47), 349 (4.49), 571 (4.75)。
- 色素(6): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (log  
 ) : 285 (4.04), 311 sh (4.17), 538 (3.55)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 283 (4.08), 332 (3.64)  
 , 530 (4.19); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 288 (3.99), 31  
 3 (3.94), 571 (4.28)。
- 色素(7): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (log  
 ) : 284 (4.30), 308 sh (4.19), 531 (3.89  
 ); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.33), 311 (4.17  
 ), 375 sh (3.58), 530 (4.35); AlCl<sub>3</sub>-MeOH:  
 289 (4.26), 311 (4.27), 411 (3.70), 573  
 (4.44)。
- 色素(8): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (log  
 ) : 284 (4.49), 311 sh (4.39), 553 (3.17  
 ); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.51), 314 (4.39  
 ), 530 (4.52); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.45), 3  
 13 (4.47), 570 (4.60)。
- 色素(9): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (lo  
 g ) : 285 (4.61), 331 (4.46), 532 (4.53)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.65), 330 (4.50)  
 , 530 (4.69); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.48), 31  
 4 (4.47), 349 (4.49), 571 (4.75)。
- 色素(10): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (lo  
 g ) : 282 (4.12), 333 (3.26), 530 (4.27)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 282 (4.19), 332 (3.40)  
 , 530 (4.42); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 287 sh (4.00),  
 313 (3.82), 409 (3.57), 570 (4.50)。
- 色素(15): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (lo  
 g ) : 283 (4.00), 311 sh (3.22), 530 (3.0  
 8); 0.01% HCl-MeOH: 282 (4.54), 331 (3.9  
 7), 529 (4.74); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 272 (4.43),  
 312 (4.24), 571 (4.85)。

## 【0063】

質量分析計 (positive-ion Electrospray Ionization-Mass Spectrometer; ESI-MS) を用いて、図1で示した(1)~(4)、(6)~(10)及び(15)のアントシアニン色素の質量を測定した。

色素(1): ESI-MS (m/z):	581.37	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> 581.41)。	
色素(2): ESI-MS (m/z):	727.37	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>35</sub> H <sub>35</sub> O <sub>17</sub> 727.53)。	
色素(3): ESI-MS (m/z):	727.38	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>35</sub> H <sub>35</sub> O <sub>17</sub> 727.53)。	10
色素(4): ESI-MS (m/z):	743.35	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>35</sub> H <sub>35</sub> O <sub>18</sub> 743.53)。	
色素(6): ESI-MS (m/z):	449.21	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> 449.31)。	
色素(7): ESI-MS (m/z):	595.19	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub> 595.44)。	
色素(8): ESI-MS (m/z):	595.14	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub> 595.44)。	
色素(9): ESI-MS (m/z):	611.22	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub> 611.44)。	20
色素(10): ESI-MS (m/z):	581.18	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> 581.41)。	
色素(15): ESI-MS (m/z):	449.23	M <sup>+</sup>	(Calcd for C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> 449.31)。	

以上の結果、理論値と測定値がよく一致した。

## 【0064】

〔実施例2〕ホンコンツバキ (*C. hongkongensis* Seem.) の分析

(1) 花卉から色素の抽出と単離、精製の方法

ホンコンツバキから花卉を採集した。採集した花卉10kgに直接、酢酸とメタノールを1対1で混合した溶液(50%酢酸-メタノール)20Lを加え、20~25℃でアントシアニン色素を抽出した。抽出液を綿栓でろ過した後、溶媒を減圧下、ロータリーエバポレーターで留去した。抽出残渣を5%酢酸水溶液に溶解し、オープンカラムクロマトグラフィーに付した。オープンカラムクロマトグラフィーの条件は、固定相にエムシーアイゲルCHP-20P (MCI gel CHP-20P、三菱化学株式会社、Mitsubishi Chemical Corporation)、セファデックスLH-20 (Sephadex LH-20、GE Healthcare Biosciences AB)、クロマトレックスODS (Chromatorex ODS、富士シリシア化学株式会社、Fuji Silysia Chemical LTD.) を用い、移動相にA液として5%酢酸水溶液、B液として5%酢酸-メタノールを用い、A液からB液の含量を10%ずつ増やすことによって、MCI gelのカラム(以下MCIカラム)-Sephadex LH-20カラム-ODSカラムの順番で各種クロマトグラフィーを行った。また、固定相にセファデックスLH-20 (Sephadex LH-20、GE Healthcare Biosciences AB) を用い、移動相にA液として5%酢酸水溶液、C液として5%酢酸-アセトン(アセトンに酢酸を5%量加えたもの)を用い、C液からA液の含量を2%ずつ増やすことによってクロマトグラフィーを行った。最後に、Sephadex LH-20カラムとODSカラムを用い、移動相にA液として5%酢酸水溶液、B液として5%酢酸-メタノールを用い、A液からB液の含量を5%ずつ増やすことを繰り返した。これらのオープンカラムクロマトグラフィーを繰り返すことによって、アントシアニン色素として、cyanidin 3-O-glucoside

copyranoside (6)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside (7)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside (8)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-β-glucopyranoside (9)、cyanidin 3-O-β-galactopyranoside (15)、cyanidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-β-galactopyranoside (16)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-β-galactopyranoside (17)、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-β-galactopyranoside (18)、delphinidin 3-O-β-glucopyranoside (19)、delphinidin 3-O-(6-O-(Z)-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside (20)、delphinidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside (21)、delphinidin 3-O-(6-O-(E)-caffeoyl)-β-glucopyranoside (22)を単離及び精製した(図2)。単離及び精製したアントシアニン色素のうち、(16)、(17)、(18)は新規な色素である(図2)。

10

## 【0065】

## (2)色素の各種スペクトルデータ

単離・精製したアントシアニン色素のプロトン核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H-Nuclear magnetic resonance [NMR] spectrum}$ )を測定した。測定装置は、JNM-ECA600型核磁気共鳴装置(JEOL JNM-ECA600KS、日本電子データム株式会社、JEOL DATUM LTD.)を用いた。測定は、 $\text{CD}_3\text{OD}$ と $\text{CF}_3\text{COOD}$ の9対1混合溶液を用いて行った。その結果を表4~表6に示す。表中の数値はデルタ(、ppm)で示す。また、二番目に表された数値は、カップリング定数(J値)を示している。表中の記号で、brは、broad、sはsinglet、dはdoublet、ddはdouble doublet、dddはdouble double doublet、tはtriplet、mはmultipletを示す。

20

## 【0066】

30

【表 4】

Pigments	6	7	8	9
<b>Aglycone</b>				
Cyanidin				
4	8.90 <i>s</i>	8.75 <i>s</i>	8.82 <i>s</i>	8.74 <i>s</i>
6	6.62 <i>d</i> 2.0	6.62 <i>d</i> 2.2	6.50 <i>d</i> 1.7	6.50 <i>d</i> 1.8
8	6.79 <i>d</i> 2.0	6.71 <i>br.d</i>	6.76 <i>d</i> 1.7	6.66 <i>d</i> 1.8
2'	7.93 <i>d</i> 2.2	7.96 <i>d</i> 1.9	7.92 <i>d</i> 2.1	7.83 <i>d</i> 2.2
5'	6.92 <i>d</i> 8.7	6.99 <i>d</i> 8.6	6.94 <i>d</i> 8.5	6.87 <i>d</i> 8.7
6'	8.14 <i>dd</i> 8.7,2.2	8.16 <i>dd</i> 8.6,1.9	8.14 <i>dd</i> 8.5,2.1	8.06 <i>dd</i> 8.7,2.2
<b>Sugars</b>				
Glucose				
1"	5.31 <i>d</i> 7.7	5.30 <i>d</i> 7.7	5.32 <i>d</i> 7.6	5.33 <i>d</i> 7.7
2"	3.71 <i>dd</i> 8.9,7.7	3.72 <i>dd</i> 8.9,7.7	3.74 <i>dd</i> 8.9,7.6	3.74 <i>dd</i> 8.9,7.7
3"	3.60 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.59 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.63 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.66 <i>dd</i> 9.1,8.9
4"	3.51 <i>dd</i> 9.7,9.1	3.45 <i>t</i> 9.4	3.51 <i>dd</i> 9.6,9.1	3.56 <i>dd</i> 9.6,9.1
5"	3.62 <i>ddd</i> 9.7,5.8,2.0	3.86 <i>ddd</i> 9.5,7.5,2.7	3.86 <i>ddd</i> 9.6,7.5,2.0	3.87 <i>ddd</i> 9.6,7.0,2.2
6"a	3.97 <i>dd</i> 12.2,2.0	4.47 <i>dd</i> 12.2,2.7	4.54 <i>dd</i> 12.0,2.0	4.55 <i>dd</i> 12.0,2.2
6"b	3.79 <i>dd</i> 12.2,5.8	4.45 <i>dd</i> 12.2,7.5	4.39 <i>dd</i> 12.0,7.5	4.39 <i>dd</i> 12.0,7.0
<b>Acyl groups</b>				
		<i>Z</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> -caffeoyl
2		7.35 <i>d</i> 8.7	7.24 <i>d</i> 8.5	6.82 <i>br.s</i>
3		6.53 <i>d</i> 8.7	6.74 <i>d</i> 8.5	
5		6.53 <i>d</i> 8.7	6.74 <i>d</i> 8.5	6.67 <i>m</i>
6		7.35 <i>d</i> 8.7	7.24 <i>d</i> 8.5	6.67 <i>m</i>
$\alpha$		5.74 <i>d</i> 12.8	6.22 <i>d</i> 15.9	6.14 <i>d</i> 15.8
$\beta$		6.58 <i>d</i> 12.8	7.39 <i>d</i> 15.9	7.31 <i>d</i> 15.8

*br.*, broad; *s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, double doublet; *m*, multiplet; *t*, triplet

【 0 0 6 7 】

10

20

【表 5】

Pigments	15	16	17	18
<b>Aglycone</b>				
Cyanidin				
4	8.99 <i>s</i>	8.88 <i>s</i>	8.90 <i>s</i>	8.94 <i>s</i>
6	6.64 <i>d</i> 1.7	6.51 <i>d</i> 1.7	6.51 <i>d</i> 1.8	6.55 <i>br.s</i>
8	6.86 <i>d</i> 1.7	6.76 <i>d</i> 1.7	6.79 <i>d</i> 1.8	6.83 <i>br.s</i>
2'	8.05 <i>d</i> 2.2	7.99 <i>d</i> 2.4	8.01 <i>d</i> 2.2	8.07 <i>br.s</i>
5'	6.99 <i>d</i> 8.7	6.98 <i>d</i> 8.7	6.98 <i>d</i> 8.7	7.05 <i>d</i> 8.5
6'	8.21 <i>dd</i> 8.7,2.2	8.20 <i>dd</i> 8.7,2.4	8.20 <i>dd</i> 8.7,2.2	8.23 <i>br.d</i> 8.5
<b>Sugars</b>				
Galactose				
1"	5.26 <i>d</i> 7.7	5.30 <i>d</i> 7.7	5.28 <i>d</i> 7.7	5.27 <i>d</i> 7.7
2"	4.02 <i>dd</i> 9.6,7.7	4.05 <i>dd</i> 9.6,7.7	4.05 <i>dd</i> 9.4,7.7	4.05 <i>dd</i> 9.4,7.7
3"	3.72 <i>dd</i> 9.6,3.4	3.76 <i>dd</i> 9.6,3.2	3.76 <i>dd</i> 9.4,3.2	3.75 <i>dd</i> 9.4,3.2
4"	3.98 <i>br.d</i> 3.2	4.01 <i>br.d</i> 3.2	4.00 <i>br.d</i> 3.0	4.01 <i>br.d</i> 3.1
5"	3.83 <i>br.dd</i> 8.1,5.6	3.85 <i>br.dd</i> 8.7,3.5	4.12 <i>br.dd</i> 8.9,3.6	4.13 <i>br.dd</i> 8.9,3.6
6"a	3.84 <i>dd</i> 11.5,8.0	4.57 <i>dd</i> 11.6,8.7	4.58 <i>dd</i> 11.6,8.9	4.59 <i>dd</i> 11.6,8.9
6"b	3.80 <i>dd</i> 11.5,5.6	4.32 <i>dd</i> 11.6,3.5	4.32 <i>dd</i> 11.6,3.6	4.32 <i>dd</i> 11.6,3.7
<b>Acyl groups</b>				
		<i>Z</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> -caffeoyl
2		7.35 <i>d</i> 8.7	7.26 <i>d</i> 8.5	6.92 <i>br.s</i>
3		6.53 <i>d</i> 8.7	6.78 <i>d</i> 8.5	
5		6.53 <i>d</i> 8.7	6.78 <i>d</i> 8.5	6.78 <i>m</i>
6		7.35 <i>d</i> 8.7	7.26 <i>d</i> 8.5	6.78 <i>m</i>
α		5.75 <i>d</i> 12.8	6.24 <i>d</i> 15.9	6.21 <i>d</i> 15.8
β		6.58 <i>d</i> 12.8	7.41 <i>d</i> 15.9	7.36 <i>d</i> 15.8

*br.*, broad; *s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, double doublet; *m*, multiplet.

【 0 0 6 8 】

【表 6】

Pigments	19	20	21	22
Aglycone				
Delphinidin				
4	8.84 <i>s</i>	8.71 <i>s</i>	8.83 <i>s</i>	8.85 <i>s</i>
6	6.69 <i>s</i>	6.62 <i>s</i>	6.52 <i>d</i> 1.8	6.52 <i>d</i> 1.8
8	6.87 <i>s</i>	6.69 <i>s</i>	6.76 <i>d</i> 1.8	6.79 <i>d</i> 1.8
2'	7.74 <i>s</i>	7.71 <i>s</i>	7.70 <i>s</i>	7.74 <i>s</i>
5'				
6'	7.74 <i>s</i>	7.71 <i>s</i>	7.70 <i>s</i>	7.74 <i>s</i>
Sugar				
Glucose				
1"	5.39 <i>d</i> 7.5	5.34 <i>d</i> 7.5	5.36 <i>d</i> 7.7	5.36 <i>d</i> 7.7
2"	3.58 <i>dd</i> 8.9,7.5	3.77 <i>dd</i> 8.8,7.5	3.78 <i>dd</i> 8.9,7.7	3.77 <i>dd</i> 8.9,7.7
3"	3.41 <i>t</i> 8.9	3.60 <i>dd</i> 9.0,8.8	3.64 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.61 <i>dd</i> 9.1,8.9
4"	3.26 <i>t</i> 8.9	3.45 <i>dd</i> 9.5,9.0	3.51 <i>dd</i> 9.6,9.1	3.49 <i>dd</i> 9.6,9.1
5"	3.53 <i>br.dd</i> 8.9,5.5	3.87 <i>ddd</i> 9.5,7.6,2.8	3.88 <i>ddd</i> 9.6,7.5,2.2	3.87 <i>ddd</i> 9.6,7.5,2.2
6"a	3.73 <i>dd</i> 12.2,2.2	4.48 <i>dd</i> 12.0,2.8	4.53 <i>dd</i> 12.0,2.2	4.52 <i>dd</i> 12.0,2.2
6"b	3.51 <i>dd</i> 12.2,5.5	4.46 <i>dd</i> 12.0,7.6	4.39 <i>dd</i> 12.0,7.5	4.39 <i>dd</i> 12.0,7.5
Acyl groups				
		<i>Z</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> -caffeoyl
2		7.35 <i>d</i> 8.7	7.26 <i>d</i> 8.5	6.91 <i>d</i> 2.0
3		6.52 <i>d</i> 8.7	6.77 <i>d</i> 8.5	
5		6.52 <i>d</i> 8.7	6.77 <i>d</i> 8.5	6.77 <i>d</i> 8.4
6		7.35 <i>d</i> 8.7	7.26 <i>d</i> 8.5	6.76 <i>dd</i> 8.4,2.0
α		5.74 <i>d</i> 12.9	6.22 <i>d</i> 15.8	6.21 <i>d</i> 15.8
β		6.59 <i>d</i> 12.9	7.41 <i>d</i> 15.8	7.37 <i>d</i> 15.8

br., broad; *s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, double doublet; *t*, triplet.

## 【0069】

単離・精製したアントシアニン色素の炭素13核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C}$ -Nuclear magnetic resonance [NMR] spectrum) を測定した。測定装置は、JNM-ECA600型核磁気共鳴装置 (JEOL JNM-ECA600KS、日本電子データム株式会社、JEOL DATUM LTD.) を用いた。測定は、 $\text{CD}_3\text{OD}$ と $\text{CF}_3\text{COOD}$ の9対1混合溶液を用いて行った。その結果を表7~表9に示す。表中の数値はデルタ (、ppm) で示す。また表中、C (Z) はパラクマル酸のZ型、C (E) はパラクマル酸のE型、Caf (E) はカフェー酸のシグナルであることを示す。shはshoulderである。

## 【0070】

10

20

30



【表 7】

Pigments	6	7	8	9
Aglycone				
Cyanidin				
2	163.6	163.8	164.1	163.5
3	145.6	145.3	145.1	145.0
4	136.5	135.8	136.8	136.4
5	159.3	159.3	159.2	159.2
6	103.5	103.5	103.7	103.8
7	170.6	170.5	170.6	170.7
8	95.3	95.3	95.3	95.4
9	157.5	157.5	157.6	157.4
10	113.4	113.4	113.3	113.2
1'	121.2	121.2	121.2	121.1
2'	118.4	118.5	118.9	118.2
3'	147.4	147.4	147.4	147.3
4'	155.8	155.9	155.8	155.7
5'	117.5	117.5	117.5	117.4
6'	128.3	128.4	128.4	128.3
Sugars				
Glucose				
1"	103.6	102.8	103.1	103.1
2"	74.8	74.7	74.8	74.8
3"	78.2	78.0	77.9	77.9
4"	71.1	71.9	71.8	71.6
5"	77.8	76.1	76.1	76.1
6"	62.4	64.4	64.6	64.5
Acyl groups				
		C(Z)	C(E)	Caf(E)
1		127.3	127.0	127.6
2		133.6	131.3	115.5
3		115.8	116.9	149.5
4		159.9	161.3	146.6
5		115.8	116.9	116.5
6		133.6	131.3	123.1
$\alpha$		115.9	114.7	114.7
$\beta$		144.6	146.9	147.3
C=O		168.4	169.1	169.2

C(Z), Z -p -coumaroyl; C(E), E -p -coumaroyl; Caf(E), E -caffeoyl.

【表 8】

Pigments	15	16	17	18
Aglycone				
Cyanidin				
2	164.2	164.2	164.4	164.5
3	145.8	145.2	145.3	145.1
4	136.9	135.8	136.9	137.1
5	159.2	159.2	159.3	159.1
6	103.5	103.6	103.7	103.8
7	170.6	170.5	170.6	170.8
8	95.2	95.3	95.3	95.3
9	157.7	157.5	157.7	157.8
10	113.5	113.2	113.3	113.3
1'	121.3	121.2	121.2	121.3
2'	118.6	118.4	118.5	118.6
3'	147.4	147.4	147.5	147.5
4'	155.8	155.8	155.9	155.9
5'	117.6	117.5	117.5	117.4
6'	128.3	128.3	128.3	128.3
Sugars				
Galactose				
1"	104.4	103.6	103.7	103.8
2"	72.2	71.9	71.9	72.0
3"	75.0	74.7	74.8	74.8
4"	70.2	70.2	70.2	70.2
5"	77.9	75.2	75.2	75.2
6"	62.5	64.6	64.6	64.6
Acyl groups				
		C(Z)	C(E)	Caf(E)
1		127.3	127.1	127.7
2		133.6	131.3	115.6
3		115.8	116.9	149.7
4		159.9	161.4	146.8
5		115.8	116.9	116.6
6		133.6	131.3	123.2
α		115.9	114.7	114.8
β		144.5	146.9	147.3
C=O		168.4	169.1	169.1
C(Z), Z -p -coumaroyl; C(E), E -p -coumaroyl; Caf(E), E -caffeoyl.				

【 0 0 7 2 】

10

20

30

40

【表 9】

Pigments	19	20	21	22
Aglycone				
Delphinidin				
2	163.6	163.8	164.1	164.3
3	145.4	145.5	145.3	145.3
4	135.8	135.8	135.9	135.9
5	159.2	159.2	159.2	159.1
6	103.7	103.4	103.7	103.7
7	170.5	170.3	170.5	170.5
8	95.3	95.1	95.2	95.2
9	157.7	157.4	157.6	157.7
10	113.3	113.3	113.2	113.2
1'	120.2	120.1	120.1	120.1
2'	112.7	112.7	112.7	112.7
3'	147.5	147.6	147.6	147.6
4'	144.7	144.6	144.8	144.8
5'	147.5	147.6	147.6	147.6
6'	112.7	112.7	112.7	112.7
Sugars				
Glucose				
1"	103.6	102.4	102.8	102.9
2"	74.8	74.6	74.7	74.7
3"	78.0	77.9	77.9	77.9
4"	71.2	71.9	71.9	71.8
5"	77.8	76.1	76.1	76.1
6"	62.4	64.4	64.6	64.5
Acyl groups				
		C(Z)	C(E)	Caf(E)
1		127.3	127.1	127.6
2		133.6	131.3	115.5
3		115.7	116.9	149.6
4		159.9	161.4	146.8
5		115.7	116.9	116.5
6		133.6	131.3	123.0
$\alpha$		115.8	114.6	114.7
$\beta$		144.6	147.0	147.3
C=O		168.4	169.2	169.1

C(Z), Z -p -coumaroyl; C(E), E -p -coumaroyl; Caf(E), E -caffeoyl.

## 【0073】

図2で示した(6)~(9)及び(15)~(22)のアントシアニン色素の紫外部吸収スペクトル(Ultra Violet spectrum)を測定した。測定には、島津製作所株式会社の分光機器(UV-visible recording spectrometer、UV-2100)を用いた。その結果は次の通りである。測定溶媒はメタノールである。

色素(6): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $m_{ax}$  MeOH (nm) (log ) : 285 (4.04), 311 sh (4.17), 538 (3.55); 0.01% HCl-MeOH: 283 (4.08), 332 (3.64), 530 (4.19); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 288 (3.99), 313 (3.94), 571 (4.28)。

色素(7): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 284 (4.30), 308 sh (4.19), 531 (3.89  
 ); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.33), 311 (4.17  
 ), 375 sh (3.58), 530 (4.35); AlCl<sub>3</sub>-MeOH:  
 289 (4.26), 311 (4.27), 411 (3.70), 573  
 (4.44)。

色素(8): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 284 (4.49), 311 sh (4.39), 553 (3.17)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.51), 314 (4.39)  
 , 530 (4.52); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.45), 31  
 3 (4.47), 570 (4.60)。

10

色素(9): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 285 (4.61), 331 (4.46), 532 (4.53)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.65), 330 (4.50)  
 , 530 (4.69); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.48), 31  
 4 (4.47), 349 (4.49), 571 (4.75)。

色素(15): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 283 (4.00), 311 sh (3.22), 530 (3.0  
 8); 0.01% HCl-MeOH: 282 (4.54), 331 (3.9  
 7), 529 (4.74); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 272 (4.43),  
 312 (4.24), 571 (4.85)。

20

色素(16): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 285 (4.26), 309 (4.14), 531 (4.06)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.28), 310 (4.15)  
 , 530 (4.28); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.25), 31  
 3 (4.27), 405 (3.66), 571 (4.39)。

色素(17): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 285 (4.29), 311 sh (4.19), 531 (4.1  
 0); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.31), 312 (4.1  
 9), 530 (4.32); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.25),  
 313 (4.26), 401 (3.54), 558 (4.32)。

30

色素(18): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 285 (4.27), 330 (4.14), 531 (4.00)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.30), 330 (4.18)  
 , 531 (4.29); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 287 (4.13), 31  
 2 (4.13), 351 (4.16), 569 (4.38)。

色素(19): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 281 (3.96), 319 sh (3.16), 544 (4.3  
 7); 0.01% HCl-MeOH: 278 (4.08), 333 (4.4  
 6), 542 (4.35); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 277 (4.03),  
 318 (3.68), 580 (4.41)。

40

色素(20): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 285 (4.32), 308 (3.84), 545 (3.04)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 285 (4.32), 300 (4.25)  
 , 545 (4.16); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 288 (4.32), 31  
 5 (4.27), 586 (4.25)。

色素(21): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log  
 ) : 285 (4.28), 307 (4.24), 544 (3.79)  
 ; 0.01% HCl-MeOH: 283 (4.31), 299 (4.26)  
 , 542 (4.36); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 288 (4.27), 31

50

5 (4.27), 584 (4.43)。

色素(22): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 284 (4.05), 318 sh (3.90), 329 (3.94), 548 (3.74); 0.01% HCl-MeOH: 282 (4.11), 317 sh (3.94), 332 (3.98), 544 (4.20); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 285 (4.00), 329 sh (4.01), 350 (4.06), 587 (4.26)。

#### 【0074】

質量分析計(positive-ion Electrospray Ionization-Mass Spectrometer; ESI-MS)を用いて、図2で示した(6)~(9)及び(15)~(22)のアントシアニン色素の質量を測定した。

色素(6): ESI-MS (m/z): 449.21 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>11</sub> 449.31)。

色素(7): ESI-MS (m/z): 595.19 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>13</sub> 595.44)。

色素(8): ESI-MS (m/z): 595.14 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>13</sub> 595.44)。

色素(9): ESI-MS (m/z): 611.22 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>14</sub> 611.44)。

色素(15): ESI-MS (m/z): 449.23 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>11</sub> 449.31)。

色素(16): ESI-MS (m/z): 595.19 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>13</sub> 595.44)。

色素(17): ESI-MS (m/z): 595.17 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>13</sub> 595.44)。

色素(18): ESI-MS (m/z): 611.39 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>14</sub> 611.44)。

色素(19): ESI-MS (m/z): 465.23 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>12</sub> 465.31)。

色素(20): ESI-MS (m/z): 611.35 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>14</sub> 611.44)。

色素(21): ESI-MS (m/z): 611.22 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>14</sub> 611.44)。

色素(22): ESI-MS (m/z): 627.37 M<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>15</sub> 627.43)。

以上の結果、理論値と測定値がよく一致した。

#### 【0075】

〔実施例3〕サルウインツバキ(C. saluenensis Stapf ex Beam)の分析

(1) 花卉から色素の抽出と単離、精製の方法

サルウインツバキから花卉を採集した。採集した花卉は、褐変を防ぐため熱湯に3~5秒間浸漬し、ポリフェノールオキシダーゼなどの酵素を死活させた。浸漬後、花卉を室温で乾燥させた。乾燥花卉3kgに、酢酸とメタノールを1対1で混合した溶液(50%酢酸-メタノール)13Lを加え、20~25℃でアントシアニン色素を抽出した。抽出液を綿栓でろ過した後、溶媒を減圧下、ロータリーエバポレーターで留去した。抽出残渣を5%酢酸水溶液に溶解し、オープンカラムクロマトグラフィーに付した。オープンカラムクロマトグラフィーの条件は、固定相にエムシーアイゲルCHP-20P(MCI gel CHP-20P、三菱化学株式会社、Mitsubishi Chemical Corporation)、セファデックスLH-20(Sephadex LH-20、GE Healthcare Biosciences AB)、クロマトレックスOD

S (Chromatorex ODS、富士シリシア化学株式会社、Fuji Silysia Chemical LTD.) を用い、移動相に A 液として 5% 酢酸水溶液、B 液として 5% 酢酸 - メタノールを用い、A 液から B 液の含量を 10% ずつ増やすことによって、MC Igel のカラム (以下 MC I カラム) - Sephadex LH - 20 カラム - ODS カラムの順番で各種クロマトグラフィーを行った。また、固定相にセファデックス LH - 20 (Sephadex LH - 20、GE Healthcare Biosciences AB) を用い、移動相に A 液として 5% 酢酸水溶液、C 液として 5% 酢酸 - アセトン (アセトンに酢酸を 5% 量加えたもの) を用い、C 液から A 液の含量を 2% ずつ増やすことによってクロマトグラフィーを行った。次いで、Sephadex LH - 20 カラムと ODS カラムを用い、移動相に A 液として 5% 酢酸水溶液、B 液として 5% 酢酸 - メタノールを用い、A 液から B 液の含量を 5% ずつ増やすことを繰り返した。これらのオープンカラムクロマトグラフィーを繰り返し行うことによって、アントシアニン色素として、cyanidin 3 - O - - glucopyranoside (6)、cyanidin 3 - O - (6 - O - (Z) - p - coumaroyl) - - glucopyranoside (7)、cyanidin 3 - O - (6 - O - (E) - p - coumaroyl) - - glucopyranoside (8)、cyanidin 3, 5 - di - O - - glucopyranoside (23)、cyanidin 3 - O - (6 - O - (Z) - p - coumaroyl - - glucopyranoside) - 5 - - glucopyranoside (24)、cyanidin 3 - O - (6 - O - (E) - p - coumaroyl - - glucopyranoside) - 5 - - glucopyranoside (25) を単離及び精製した (図 3)。

10

20

#### 【0076】

##### (2) 色素の各種スペクトルデータ

単離・精製したアントシアニン色素のプロトン核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H-Nuclear magnetic resonance [NMR] spectrum}$ ) を測定した。測定装置は、JNM-ECA600 型核磁気共鳴装置 (JEOL JNM-ECA600KS、日本電子データム株式会社、JEOL DATUM LTD.) を用いた。測定は、 $\text{CD}_3\text{OD}$  と  $\text{CF}_3\text{COOD}$  の 9 対 1 混合溶液を用いて行った。その結果を表 10 及び表 11 に示す。表中の数値はデルタ (  $\delta$ 、ppm) で示す。また、二番目に表された数値は、カップリング定数 (J 値) を示している。表中の記号で、br は、broad、s は singlet、d は doublet、dd は double doublet、ddd は double double doublet、t は triplet、m は multiplet を示す。

30

#### 【0077】

【表 1 0】

Pigments	6	7	8	
<b>Aglycone</b>				
	<b>Cyanidin</b>			
4	8.93 <i>s</i>	8.73 <i>s</i>	8.89 <i>s</i>	
6	6.63 <i>s</i>	6.62 <i>d</i> 1.9	6.53 <i>d</i> 2.0	
8	6.82 <i>s</i>	6.69 <i>d</i> 1.9	6.81 <i>d</i> 2.0	
2'	7.97 <i>br.s</i>	7.95 <i>d</i> 2.2	7.99 <i>d</i> 2.1	
5'	6.95 <i>d</i> 8.9	6.99 <i>d</i> 8.7	7.00 <i>d</i> 8.9	
6'	8.16 <i>br.d</i> 8.9	8.14 <i>dd</i> 8.7,2.2	8.23 <i>dd</i> 8.9,2.1	10
<b>Sugars</b>				
	<b>Glucose</b>			
1"	5.31 <i>d</i> 7.5	5.32 <i>d</i> 7.7	5.32 <i>d</i> 7.6	
2"	3.71 <i>dd</i> 8.9,7.5	3.73 <i>dd</i> 8.9,7.7	3.73 <i>dd</i> 8.9,7.6	
3"	3.60 <i>dd</i> 9.6,8.9	3.61 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.60 <i>t</i> 8.9	
4"	3.51 <i>dd</i> 9.6,8.9	3.46 <i>dd</i> 9.5,9.1	3.49 <i>dd</i> 9.6,8.9	
5"	3.61 <i>ddd</i> 8.9,5.5,2.0	3.86 <i>ddd</i> 9.5,7.5,3.1	3.85 <i>ddd</i> 9.6,7.6,2.1	
6"a	3.96 <i>dd</i> 12.3,2.0	4.48 <i>dd</i> 12.0,3.1	4.52 <i>dd</i> 12.3,2.1	
6"b	3.77 <i>dd</i> 12.3,5.5	4.46 <i>dd</i> 12.0,7.5	4.37 <i>dd</i> 12.3,7.6	
<b>Acyl groups</b>				
		<b>Z -p -coumaroyl</b>	<b>E -p -coumaroyl</b>	20
2		7.34 <i>d</i> 8.7	7.28 <i>d</i> 8.5	
3		6.53 <i>d</i> 8.7	6.78 <i>d</i> 8.5	
5		6.53 <i>d</i> 8.7	6.78 <i>d</i> 8.5	
6		7.34 <i>d</i> 8.7	7.28 <i>d</i> 8.5	
α		5.73 <i>d</i> 12.8	6.21 <i>d</i> 15.8	
β		6.58 <i>d</i> 12.8	7.42 <i>d</i> 15.8	

*s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, double doublet; *t*, triplet; *br.*, broad.

【 0 0 7 8】

【表 1 1】

Pigments	23	24	25	
<b>Aglycone</b>				
Cyanidin				
4	9.09 <i>s</i>	8.66 <i>s</i>	8.86 <i>s</i>	
6	7.05 <i>d</i> 2.2	6.95 <i>d</i> 1.9	6.95 <i>d</i> 2.0	
8	7.07 <i>d</i> 2.2	6.84 <i>d</i> 1.9	6.83 <i>d</i> 2.0	
2'	8.03 <i>d</i> 2.4	7.97 <i>d</i> 2.2	7.91 <i>d</i> 2.4	
5'	7.02 <i>d</i> 8.7	7.03 <i>d</i> 8.7	6.94 <i>d</i> 8.7	
6'	8.27 <i>dd</i> 8.7,2.4	8.17 <i>dd</i> 8.7,2.2	8.15 <i>dd</i> 8.7,2.4	10
<b>Sugars</b>				
Glucose I				
1"	5.35 <i>d</i> 7.9	5.45 <i>d</i> 7.9	5.46 <i>d</i> 7.9	
2"	3.73 <i>dd</i> 8.9,7.9	3.77 <i>dd</i> 8.9,7.9	3.77 <i>dd</i> 8.9,7.9	
3"	3.69 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.59 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.61 <i>dd</i> 9.2,8.9	
4"	3.51 <i>dd</i> 9.4,9.1	3.46 <i>dd</i> 9.4,9.1	3.56 <i>dd</i> 9.4,9.2	
5"	3.60 <i>ddd</i> 9.4,6.8,2.0	3.95 <i>ddd</i> 9.4,8.4,2.0	3.92 <i>ddd</i> 9.4,6.8,2.5	
6"a	3.99 <i>dd</i> 12.0,2.0	4.57 <i>dd</i> 11.8,8.4	4.52 <i>dd</i> 12.2,2.5	
6"b	3.78 <i>dd</i> 12.0,6.8	4.42 <i>dd</i> 11.8,2.0	4.47 <i>dd</i> 12.2,6.8	
Glucose II				
1'''	5.20 <i>d</i> 7.7	5.19 <i>d</i> 7.7	5.17 <i>d</i> 7.9	20
2'''	3.72 <i>dd</i> 8.9,7.7	3.78 <i>dd</i> 8.9,7.7	3.75 <i>dd</i> 8.7,7.9	
3'''	3.68 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.65 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.64 <i>dd</i> 9.1,8.7	
4'''	3.46 <i>dd</i> 9.4,9.1	3.49 <i>dd</i> 9.4,9.1	3.48 <i>dd</i> 9.4,9.1	
5'''	3.61 <i>ddd</i> 9.4,5.6,2.0	3.62 <i>ddd</i> 9.4,6.1,2.2	3.62 <i>ddd</i> 9.4,5.6,2.2	
6'''a	3.98 <i>dd</i> 12.2,2.0	4.05 <i>dd</i> 12.0,2.2	3.99 <i>dd</i> 12.2,2.2	
6'''b	3.79 <i>dd</i> 12.2,5.6	3.83 <i>dd</i> 12.0,6.1	3.78 <i>dd</i> 12.2,5.6	
<b>Acyl groups</b>				
		<i>Z</i> - <i>p</i> -coumaroyl	<i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl	
2		7.24 <i>d</i> 8.7	7.22 <i>d</i> 8.5	
3		6.39 <i>d</i> 8.7	6.71 <i>d</i> 8.5	30
5		6.39 <i>d</i> 8.7	6.71 <i>d</i> 8.5	
6		7.24 <i>d</i> 8.7	7.22 <i>d</i> 8.5	
α		5.76 <i>d</i> 13.0	6.22 <i>d</i> 15.8	
β		6.58 <i>d</i> 13.0	7.32 <i>d</i> 15.8	

*s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, double doublet; br., broad.

## 【0079】

単離・精製したアントシアニン色素の炭素13核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C}$ -Nuclear magnetic resonance [NMR] spectrum) を測定した。測定装置は、JNM-ECA600型核磁気共鳴装置 (JEOL JNM-ECA600KS、日本電子データ株式会社、JEOL DATUM LTD.) を用いた。測定は、 $\text{CD}_3\text{OD}$ と $\text{CF}_3\text{COOD}$ の9対1混合溶液を用いて行った。その結果を表12に示す。表中の数値はデルタ (、ppm) で示す。また表中、C (Z) はパラクマル酸のZ型、C (E) はパラクマル酸のE型、Caf (E) はカフェー酸のシグナルであることを示す。

## 【0080】



【表 1 2】

Pigments	6	7	8	23	24	25
Aglycone						
Cyanidin						
2	163.8	163.8	164.1	164.6	164.1	164.6
3	145.6	145.3	145.1	146.6	146.1	145.7
4	136.6	135.8	136.8	135.8	133.8	135.4
5	159.3	159.3	159.2	156.7	156.6	156.7
6	103.5	103.5	103.7	105.7	105.0	106.0
7	170.6	170.6	170.6	169.6	169.5	169.9
8	95.2	95.3	95.3	97.5	97.1	97.5
9	157.6	157.5	157.6	157.1	156.8	156.9
10	113.4	113.4	113.3	113.3	113.1	113.1
1'	121.2	121.3	121.2	121.0	121.1	120.9
2'	118.4	118.5	118.9	118.6	118.9	118.9
3'	147.4	147.4	147.4	147.4	147.6	147.6
4'	155.8	155.9	155.8	156.5	156.6	156.7
5'	117.5	117.6	117.5	117.7	117.7	117.7
6'	128.3	128.3	128.4	129.0	128.9	128.9
Sugars						
Glucose I						
1"	103.7	102.8	103.1	102.5	101.9	102.8
2"	74.8	74.7	74.8	74.4	74.4	74.9
3"	78.8	78.0	77.9	78.5	78.3	78.2
4"	71.1	71.9	71.8	71.0	72.1	71.9
5"	78.2	76.1	76.1	78.2	75.9	75.8
6"	62.4	64.5	64.6	62.2	64.5	64.3
Glucose II						
1'''				103.8	102.3	103.1
2'''				74.6	74.8	74.6
3'''				78.8	78.8	78.9
4'''				71.2	71.4	71.3
5'''				77.5	77.9	77.9
6'''				62.5	62.7	62.6
Acyl groups						
		(Z)C	(E)C		(Z)C	(E)C
1		127.3	127.0		127.3	126.8
2		133.6	131.3		133.5	131.5
3		115.8	116.9		115.6	116.9
4		159.9	161.3		159.7	161.4
5		115.8	116.9		115.6	116.9
6		133.6	131.3		133.5	131.5
α		115.9	114.7		115.9	114.7
β		144.6	146.9		144.5	147.1
C=O		168.4	169.1		168.9	169.3

(Z)C, (Z)-p-coumaroyl; (E)C, (E)-p-coumaroyl.

## 【0081】

図3で示した(6)~(8)及び(23)~(25)のアントシアニン色素の紫外外部吸収スペクトル(Ultra Violet spectrum)を測定した。測定には、島津製作所株式会社の分光機器(UV-visible recording spec

10

20

30

40

50

trometer、UV-2100)を用いた。その結果は次の通りである。測定溶媒はメタノールである。shはshoulderを示す。

色素(6): 赤色無晶形粉末、UV-vis max MeOH (nm) (log)  
): 285 (4.04), 311 sh (4.17), 538 (3.55)  
); 0.01% HCl-MeOH: 283 (4.08), 332 (3.64)  
, 530 (4.19); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 288 (3.99), 3  
13 (3.94), 571 (4.28)。

色素(7): 赤色無晶形粉末、UV-vis max MeOH (nm) (log)  
): 284 (4.30), 308 sh (4.19), 531 (3.89)  
); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.33), 311 (4.17)  
, 375 sh (3.58), 530 (4.35); AlCl<sub>3</sub>-MeOH:  
289 (4.26), 311 (4.27), 411 (3.70), 573  
(4.44)。

色素(8): 赤色無晶形粉末、UV-vis max MeOH (nm) (log)  
): 284 (4.49), 311 sh (4.39), 553 (3.17)  
); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.51), 314 (4.39)  
, 530 (4.52); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.45), 3  
13 (4.47), 570 (4.60)。

色素(23): 赤色無晶形粉末、UV-vis max MeOH (nm) (lo  
g): 282 (3.14), 311 sh (1.89), 527 (2.7  
1); 0.01% HCl-MeOH: 279 (3.14), 331 (2.4  
9), 526 (3.43); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 284 sh (2.97)  
, 313 (2.82), 452 (2.64), 570 (3.44)。

色素(24): 赤色無晶形粉末、UV-vis max MeOH (nm) (lo  
g): 286 (4.27), 317 sh (4.09), 531 (2.5  
8); 0.01% HCl-MeOH: 281 (4.25), 294 (4.2  
2), 530 (4.34); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 281 (4.19),  
312 (4.21), 421 (3.68), 571 (4.37)。

色素(25): 赤色無晶形粉末、UV-vis max MeOH (nm) (lo  
g): 284 (4.56), 311 sh (4.46), 553 (3.23  
); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.58), 314 (4.46  
, 530 (4.59); AlCl<sub>3</sub>-MeOH: 289 (4.51), 3  
13 (4.54), 570 (4.67)。

#### 【0082】

質量分析計(positive-ion Electrospray Ionization-Mass Spectrometer; ESI-MS)を用いて、図3で示した(6)~(8)及び(23)~(25)のアントシアニン色素の質量を測定した。

色素(6): ESI-MS (m/z): 449.21 M<sup>+</sup> (Calcd for  
C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>11</sub> 449.31)。

色素(7): ESI-MS (m/z): 595.19 M<sup>+</sup> (Calcd for  
C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>13</sub> 595.44)。

色素(8): ESI-MS (m/z): 595.14 M<sup>+</sup> (Calcd for  
C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>13</sub> 595.44)。

色素(23): ESI-MS (m/z): 611.39 M<sup>+</sup> (Calcd fo  
r C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>16</sub> 611.43)。

色素(24): ESI-MS (m/z): 757.44 M<sup>+</sup> (Calcd fo  
r C<sub>36</sub>H<sub>37</sub>O<sub>18</sub> 757.55)。

色素(25): ESI-MS (m/z): 757.44 M<sup>+</sup> (Calcd fo  
r C<sub>36</sub>H<sub>37</sub>O<sub>18</sub> 757.55)。

以上の結果、理論値と測定値がよく一致した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 3 】

〔実施例 4〕園芸品種ツバキ：大理茶 ( D a l i c h a ) の分析

## ( 1 ) 花卉から色素の抽出と単離、精製の方法

園芸品種ツバキから花卉を採集した。採集した花卉は、褐変を防ぐため熱湯に 3 ~ 5 秒間浸漬し、ポリフェノールオキシダーゼなどの酵素を死活させた。浸漬後、花卉を室温で乾燥させた。乾燥花卉 2 k g に、酢酸とメタノールを 1 対 1 で混合した溶液 ( 5 0 % 酢酸 - メタノール ) 1 1 L を加え、2 0 ~ 2 5 でアントシアニン色素を抽出した。抽出液を綿栓でろ過した後、溶媒を減圧下、ロータリーエバポレーターで留去した。抽出残渣を 5 % 酢酸水溶液に溶解し、オープンカラムクロマトグラフィーに付した。オープンカラムクロマトグラフィーの条件は、固定相にエムシーアイゲル CHP - 2 0 P ( M C I g e l 10  
CHP - 2 0 P、三菱化学株式会社、Mitsubishi Chemical Corporation)、セファデックス LH - 2 0 ( S e p h a d e x L H - 2 0、G E H e a l t h c a r e B i o s c i e n c e s A B )、クロマトレックス ODS ( C h r o m a t o r e x O D S、富士シリシア化学株式会社、Fuji Silysia Chemical LTD. ) を用い、移動相に A 液として 5 % 酢酸水溶液、B 液として 5 % 酢酸 - メタノールを用い、A 液から B 液の含量を 1 0 % ずつ増やすことによって、MCIgel のカラム ( 以下 MCI カラム ) - S e p h a d e x L H - 2 0 カラム - O D S カラムの順番で各種クロマトグラフィーを行った。また、固定相にセファデックス LH - 2 0 ( S e p h a d e x L H - 2 0、G E H e a l t h c a r e B i o s c i e n c e s A B ) を用い、移動相に A 液として 5 % 酢酸水溶液、C 液として 5 % 酢酸 20  
- アセトン ( アセトンに酢酸を 5 % 量加えたもの ) を用い、C 液から A 液の含量を増やすことによってクロマトグラフィーを行った。これらのオープンカラムクロマトグラフィーを繰り返し行うことによって、アントシアニン色素として、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l ) - - g l u c o p y r a n o s i d e ( 1 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l - 6 - O - ( Z ) - p - c o u m a r o y l ) - - g l u c o p y r a n o s i d e ( 2 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l - 6 - O - ( E ) - p - c o u m a r o y l ) - - g l u c o p y r a n o s i d e ( 3 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l - 6 - O - ( E ) - c a f f e o y l ) - - g l u c o p y r a n o s i d e ( 4 )、cyanidin 3 - O 30  
- ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l - 6 - O - a c e t y l ) - - g l u c o p y r a n o s i d e ( 5 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l ) - - g a l a c t o p y r a n o s i d e ( 1 0 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l - 6 - O - ( Z ) - p - c o u m a r o y l ) - - g a l a c t o p y r a n o s i d e ( 1 1 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l - 6 - O - ( E ) - p - c o u m a r o y l ) - - g a l a c t o p y r a n o s i d e ( 1 2 )、cyanidin 3 - O - ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l - 6 - O - ( E ) - c a f f e o y l ) - - g a l a c t o p y r a n o s i d e ( 1 3 )、cyanidin 3 - O 40  
- ( 2 - O - - x y l o p y r a n o s y l - 6 - O - a c e t y l ) - - g a l a c t o p y r a n o s i d e ( 1 4 ) を単離及び精製した ( 図 4 )。単離及び精製したアントシアニン色素のうち、( 5 )、( 1 1 ) ~ ( 1 4 ) は新規な色素である ( 図 4 )。

## 【 0 0 8 4 】

## ( 2 ) 色素の各種スペクトルデータ

単離・精製したアントシアニン色素のプロトン核磁気共鳴スペクトル (  $^1\text{H-Nuclear magnetic resonance [NMR] spectrum}$  ) を測定した。測定装置は、JNM-ECA 6 0 0 型核磁気共鳴装置 ( J E O L J N M - E C A 6 0 0 K S、日本電子データム株式会社、J E O L D A T U M L T D . ) を用いた。測定は、 $\text{CD}_3\text{OD}$  と  $\text{CF}_3\text{COOD}$  の 9 対 1 混合溶液を用いて行った。その結果を表 1 3 及び表 1 4 に示す。表中の数値はデルタ (  $\delta$ 、ppm ) で示す。また、二番目に表され 50

た数値は、カップリング定数（J値）を示している。表中の記号で、brは、broad、sはsinglet、dはdoublet、ddはdouble doublet、dddはdouble double doublet、tはtriplet、mはmultipletを示す。

【0085】

【表13】

Pigments	1	2	3	4	5	
<b>Aglycone</b>						
Cyanidin						
4	8.80 <i>s</i>	8.57 <i>s</i>	8.81 <i>s</i>	8.82 <i>s</i>	8.76 <i>s</i>	
6	6.59 <i>s</i>	6.54 <i>br.s</i>	6.49 <i>d</i> 1.9	6.52 <i>d</i> 1.8	6.63 <i>d</i> 1.9	10
8	6.78 <i>s</i>	6.60 <i>br.s</i>	6.78 <i>d</i> 1.9	6.79 <i>d</i> 1.8	6.82 <i>d</i> 1.9	
2'	7.86 <i>br.s</i>	7.88 <i>d</i> 1.5	7.98 <i>d</i> 2.4	8.00 <i>d</i> 2.2	7.90 <i>d</i> 2.2	
5'	6.89 <i>d</i> 8.9	6.99 <i>d</i> 8.7	6.99 <i>d</i> 8.7	7.00 <i>d</i> 8.7	6.95 <i>d</i> 8.7	
6'	8.16 <i>br.d</i> 8.9	8.14 <i>dd</i> 8.7,1.5	8.25 <i>dd</i> 8.7,2.4	8.25 <i>dd</i> 8.7,2.2	8.20 <i>dd</i> 8.7,2.2	
<b>Sugars</b>						
Glucose						
1"	5.43 <i>d</i> 7.5	5.50 <i>d</i> 7.5	5.49 <i>d</i> 7.5	5.49 <i>d</i> 7.5	5.42 <i>d</i> 7.7	
2"	3.97 <i>dd</i> 8.9,7.5	4.02 <i>dd</i> 8.9,7.5	4.01 <i>dd</i> 8.9,7.5	4.02 <i>dd</i> 8.7,7.5	3.98 <i>dd</i> 8.9,7.7	
3"	3.84 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.87 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.84 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.83 <i>dd</i> 9.1,8.7	3.83 <i>dd</i> 9.1,8.9	
4"	3.56 <i>dd</i> 9.4,9.1	3.49 <i>dd</i> 9.6,9.1	3.54 <i>dd</i> 9.7,9.1	3.55 <i>dd</i> 9.6,9.1	3.49 <i>dd</i> 9.7,9.1	
5"	3.64 <i>br.dd</i> 9.6,5.3	3.92 <i>ddd</i> 9.6,8.2,2.0	3.90 <i>ddd</i> 9.7,7.7,2.2	3.89 <i>ddd</i> 9.6,7.5,2.2	3.86 <i>ddd</i> 9.7,7.3,1.9	
6" <sup>a</sup>	3.99 <i>dd</i> 12.5,2.0	4.49 <i>dd</i> 12.0,2.0	4.52 <i>dd</i> 12.0,2.2	4.53 <i>dd</i> 12.0,2.2	4.52 <i>dd</i> 12.2,1.9	
6" <sup>b</sup>	3.81 <i>dd</i> 12.2,5.3	4.41 <i>dd</i> 12.0,8.2	4.37 <i>dd</i> 12.0,7.7	4.39 <i>dd</i> 12.0,7.5	4.21 <i>dd</i> 12.2,7.3	
Xylose						
1 <sup>'''</sup>	4.83 <i>d</i> 7.5	4.82 <i>d</i> 7.5	4.78 <i>d</i> 7.7	4.78 <i>d</i> 7.7	4.82 <i>d</i> 7.7	20
2 <sup>'''</sup>	3.23 <i>dd</i> 9.1,7.5	3.28 <i>dd</i> 9.1,7.5	3.25 <i>dd</i> 9.1,7.7	3.25 <i>dd</i> 9.2,7.7	3.22 <i>dd</i> 8.9,7.7	
3 <sup>'''</sup>	3.36 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.37 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.36 <i>dd</i> 9.1,8.9	3.36 <i>dd</i> 9.2,8.9	3.35 <i>dd</i> 9.1,8.9	
4 <sup>'''</sup>	3.48 <i>ddd</i> 10.3,8.9,5.3	3.51 <i>ddd</i> 10.2,8.9,5.3	3.46 <i>ddd</i> 10.3,8.9,5.3	3.46 <i>ddd</i> 10.3,8.9,5.4	3.46 <i>ddd</i> 10.3,9.1,5.3	
5 <sup>'''a</sup>	3.78 <i>dd</i> 11.5,5.3	3.83 <i>dd</i> 11.5,5.3	3.78 <i>dd</i> 11.5,5.3	3.76 <i>dd</i> 11.5,5.4	3.78 <i>dd</i> 11.5,5.3	
5 <sup>'''b</sup>	3.11 <i>dd</i> 11.5,10.3	3.16 <i>dd</i> 11.5,10.2	3.13 <i>dd</i> 11.5,10.3	3.13 <i>dd</i> 11.5,10.3	3.12 <i>dd</i> 11.5,10.3	
<b>Acyl groups</b>						
		<i>Z-p</i> -coumaroyl	<i>E-p</i> -coumaroyl	<i>E</i> -caffeoyl	Acetyl	
2		7.29 <i>d</i> 8.7	7.25 <i>d</i> 8.6	6.88 <i>br s</i>	2.04 <i>s</i>	
3		6.48 <i>d</i> 8.7	6.77 <i>d</i> 8.6			
5		6.48 <i>d</i> 8.7	6.77 <i>d</i> 8.6	6.75 <i>m</i>		
6		7.29 <i>d</i> 8.7	7.25 <i>d</i> 8.6	6.75 <i>m</i>		
α		5.70 <i>d</i> 12.9	6.20 <i>d</i> 15.9	6.15 <i>d</i> 15.9		
β		6.52 <i>d</i> 12.9	7.39 <i>d</i> 15.9	7.33 <i>d</i> 15.9		

br., broad; *s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, double doublet; *m*, multiplet.

【0086】

【表 1 4】

Pigments	1	2	3*	4	5
<b>Aglycone</b>					
Cyanidin					
4	8.82 <i>s</i>	8.64 <i>s</i>	8.82 <i>s</i>	8.83 <i>s</i>	8.87 <i>s</i>
6	6.58 <i>br.s</i>	6.56 <i>d</i> 2.0	6.71 <i>br.s</i>	6.50 <i>br.s</i>	6.65 <i>d</i> 1.8
8	6.80 <i>br.s</i>	6.62 <i>d</i> 2.0	6.90 <i>br.s</i>	6.78 <i>br.s</i>	6.89 <i>d</i> 1.8
2'	7.88 <i>d</i> 2.0	7.97 <i>d</i> 2.0	8.00 <i>d</i> 2.0	8.02 <i>d</i> 2.0	8.05 <i>d</i> 2.4
5'	6.90 <i>d</i> 8.7	7.02 <i>d</i> 8.9	7.03 <i>d</i> 8.9	7.01 <i>d</i> 8.8	7.02 <i>d</i> 8.7
6'	8.16 <i>dd</i> 8.7,2.0	8.19 <i>dd</i> 8.9,2.0	8.33 <i>dd</i> 8.9,2.0	8.24 <i>dd</i> 8.8,2.0	8.28 <i>dd</i> 8.7,2.4
<b>Sugars</b>					
Galactose					
1"	5.39 <i>d</i> 7.5	5.45 <i>d</i> 7.6	5.61 <i>d</i> 7.5	5.43 <i>d</i> 7.5	5.41 <i>d</i> 7.7
2"	4.26 <i>dd</i> 9.2,7.5	4.28 <i>dd</i> 8.9,7.6	4.18 <i>dd</i> 9.2,7.5	4.27 <i>dd</i> 9.1,7.5	4.25 <i>dd</i> 9.4,7.7
3"	3.97 <i>dd</i> 9.2,3.2	3.97 <i>dd</i> 8.9,3.4	3.86 <i>dd</i> 9.2,2.7	3.95 <i>dd</i> 9.1,2.7	3.93 <i>dd</i> 9.4,3.3
4"	4.01 <i>br.d</i> 3.2	4.00 <i>br.d</i> 3.4	3.89 <i>br.d</i> 2.7	4.02 <i>br.d</i> 3.1	3.97 <i>dd</i> 3.3,0.7
5"	3.89 <i>br.dd</i> 8.2,3.2	4.15 <i>br.dd</i> 8.9,3.4	4.23 <i>br.dd</i> 8.2,3.4	4.14 <i>br.dd</i> 8.9,3.3	4.11 <i>ddd</i> 8.6,3.3,0.7
6"a	3.84 <i>dd</i> 11.8,8.2	4.76 <i>dd</i> 11.7,8.9	4.32 <i>dd</i> 11.6,8.2	4.56 <i>dd</i> 11.6,8.9	4.36 <i>dd</i> 11.8,8.6
6"b	3.82 <i>dd</i> 11.8,3.2	4.20 <i>dd</i> 11.7,3.4	4.25 <i>dd</i> 11.6,3.4	4.31 <i>dd</i> 11.6,3.3	4.28 <i>dd</i> 11.8,3.3
Xylose					
1"	4.78 <i>d</i> 7.6	4.74 <i>d</i> 7.6	4.66 <i>d</i> 7.5	4.74 <i>d</i> 7.5	4.74 <i>d</i> 7.7
2"	3.22 <i>dd</i> 8.5,7.6	3.23 <i>dd</i> 8.2,7.6	3.01 <i>dd</i> 8.2,7.5	3.24 <i>dd</i> 8.2,7.5	3.18 <i>dd</i> 8.2,7.7
3"	3.37 <i>dd</i> 8.9,8.5	3.36 <i>dd</i> 8.9,8.2	3.13 <i>dd</i> 8.9,8.2	3.35 <i>dd</i> 8.9,8.2	3.33 <i>dd</i> 8.9,8.2
4"	3.46 <i>ddd</i> 10.3,8.9,5.4	3.45 <i>ddd</i> 10.3,8.9,5.5	3.26 <i>ddd</i> 10.3,8.9,5.4	3.44 <i>ddd</i> 10.3,8.9,5.3	3.41 <i>ddd</i> 10.3,8.9,5.4
5"a	3.73 <i>dd</i> 11.5,5.4	3.76 <i>dd</i> 11.7,5.5	3.52 <i>dd</i> 11.6,5.4	3.73 <i>dd</i> 11.8,5.3	3.68 <i>dd</i> 11.5,5.4
5"b	3.10 <i>dd</i> 11.5,10.2	3.12 <i>dd</i> 11.7,10.3	2.99 <i>dd</i> 11.6,10.3	3.11 <i>dd</i> 11.8,10.3	3.06 <i>dd</i> 11.5,10.3
<b>Acyl groups</b>					
		<i>Z-p-coumaroyl</i>	<i>E-p-coumaroyl</i>	<i>E-caffeoyl</i>	<i>Acetyl</i>
2		7.29 <i>d</i> 8.9	7.42 <i>d</i> 8.5	6.88 <i>br.s</i>	2.04 <i>s</i>
3		6.47 <i>d</i> 8.9	6.81 <i>d</i> 8.5		
5		6.47 <i>d</i> 8.9	6.81 <i>d</i> 8.5	6.75 <i>m</i>	
6		7.29 <i>d</i> 8.9	7.42 <i>d</i> 8.5	6.75 <i>m</i>	
$\alpha$		5.70 <i>d</i> 13.0	6.30 <i>d</i> 15.8	6.18 <i>d</i> 15.9	
$\beta$		6.52 <i>d</i> 13.0	7.46 <i>d</i> 15.8	7.34 <i>d</i> 15.9	

br., broad; *s*, singlet; *d*, doublet; *dd*, double doublet; *m*, multiplet\* 3 & J, in acidified DMSO-d<sub>6</sub>.

10

20

30

## 【0087】

単離・精製したアントシアニン色素の炭素13核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C}$ -Nuclear magnetic resonance [NMR] spectrum) を測定した。測定装置は、JNM-ECA600型核磁気共鳴装置 (JEOL JNM-ECA600KS、日本電子データム株式会社、JEOL DATUM LTD.) を用いた。測定は、 $\text{CD}_3\text{OD}$ と $\text{CF}_3\text{COOD}$ の9対1混合溶液を用いて行った。その結果を表15に示す。表中の数値はデルタ (、ppm) で示す。また表中、C (Z) はパラクマル酸のZ型、C (E) はパラクマル酸のE型、Caf (E) はカフェー酸のシグナルであることを示す。

## 【0088】

【表 15】

Pigments	1	2	3	4	5	10	11	12*	13	14
Aglycone										
	Cyanidin									
2	163.4	163.2	164.2	164.2	164.0	163.3	163.4	162.5	164.1	164.2
3	145.2	144.8	144.8	144.9	145.1	145.2	145.1	144.6	145.0	145.4
4	135.6	134.5	136.1	136.2	135.6	135.5	134.5	134.3	136.0	135.3
5	159.2	159.1	159.2	159.2	159.1	159.1	159.1	158.3	159.5	159.1
6	103.3	103.4	103.7	103.8	103.5	103.5	103.4	103.4	103.7	103.4
7	170.4	170.3	170.5	170.7	170.6	170.3	170.3	169.1	170.5	170.4
8	95.1	95.1	95.2	95.2	95.3	95.2	95.1	95.0	95.2	95.2
9	157.2	157.0	157.5	157.6	157.5	157.2	157.1	156.6	157.5	157.6
10	113.1	113.0	113.1	113.2	113.0	113.1	113.1	112.5	113.1	113.1
1'	121.1	121.1	121.2	121.3	121.2	121.1	121.2	120.6	121.3	121.3
2'	118.3	118.5	118.9	118.9	118.4	118.2	118.7	118.4	118.7	118.7
3'	147.5	147.5	147.6	147.6	147.6	147.3	147.5	147.2	147.5	147.6
4'	155.9	155.9	155.9	155.9	156.1	155.8	155.9	155.5	155.9	156.0
5'	117.5	117.5	117.4	117.4	117.5	117.4	117.5	117.5	117.5	117.5
6'	128.9	128.8	128.8	128.8	129.1	128.9	128.7	128.5	128.7	128.8
Sugars										
	Glucose					Galactose				
1"	101.4	100.2	100.9	101.1	101.4	101.8	100.7	99.7	101.4	101.7
2"	81.5	82.0	81.9	82.0	81.4	79.8	80.3	79.3	80.2	79.9
3"	78.7	78.0	77.9	77.9	78.1	75.2	74.9	74.2	74.8	74.9
4"	71.2	71.6	71.5	71.5	71.2	70.2	70.1	69.0	70.1	70.2
5"	78.3	76.0	76.0	76.1	76.1	77.8	75.3	74.1	75.1	75.2
6"	62.3	64.2	64.5	64.5	64.8	62.4	64.3	64.7	64.5	65.2
	Xylose									
1'''	105.7	106.2	106.0	106.0	105.8	105.9	106.4	105.7	106.3	106.1
2'''	75.8	75.9	75.7	75.8	75.8	75.9	75.3	75.3	75.9	75.9
3'''	77.9	77.9	77.9	77.9	78.0	77.9	77.9	77.6	77.9	77.9
4'''	71.1	71.0	71.1	71.1	71.1	71.0	71.0	70.4	71.1	71.0
5'''	67.4	67.4	67.3	67.3	67.4	67.3	67.3	67.1	67.3	67.3
Acyl groups										
		C(Z)	C(E)	Caf(E)	Ac		C(Z)	C(E)	Caf(E)	Ac
1		127.2	126.9	127.6			127.2	126.0	127.7	
2		133.6	131.2	115.5	20.8		133.5	131.3	115.5	20.8
3		115.7	116.9	149.7			115.8	116.8	149.7	
4		159.9	161.4	146.8			159.9	161.0	146.8	
5		115.7	116.9	116.6			115.8	116.8	116.5	
6		133.6	131.2	122.9			133.5	131.3	122.9	
α		115.8	114.6	114.7			115.7	113.6	114.7	
β		144.5	146.9	147.3			144.4	146.1	147.3	
C=O		168.2	169.0	169.1	172.9		168.3	167.7	169.1	172.9

C(Z), Z-p-coumaroyl; C(E), E-p-coumaroyl; Caf(E), E-caffeoyl; Ac: acetyl.

\* δ in acidified DMSO-d<sub>6</sub>.

## 【0089】

図4で示した(1)~(5)及び(10)~(14)のアントシアニン色素の紫外部吸収スペクトル(Ultra Violet spectrum)を測定した。測定には、島津製作所株式会社の分光機器(UV-visible recording spectrometer、UV-2100)を用いた。その結果は次の通りである。測定溶媒はメタノールである。shはshoulderを示す。

色素(1): 赤色無晶形粉末、UV-vis<sub>max</sub> MeOH (nm) (log) : 282 (4.31), 379 (3.10), 538 (3.47);  
0.01% HCl-MeOH: 282 (4.37), 332 (3.68),

10

20

30

40

50

530 (4.59);  $AlCl_3$ -MeOH: 289 (4.40), 312 (4.00), 411 (3.81), 564 (4.62)。

色素(2): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 284 (4.51), 311 sh (4.40), 553 (3.18); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.53), 314 (4.40), 530 (4.54);  $AlCl_3$ -MeOH: 289 (4.46), 313 (4.49), 570 (4.61)。

色素(3): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 284 (4.58), 311 sh (4.48), 553 (3.25); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.60), 314 (4.48), 530 (4.61);  $AlCl_3$ -MeOH: 289 (4.53), 313 (4.56), 570 (4.69)。

色素(4): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 285 (4.61), 331 (4.46), 532 (4.53); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.65), 330 (4.50), 530 (4.69);  $AlCl_3$ -MeOH: 289 (4.48), 314 (4.47), 349 (4.49), 571 (4.75)。

色素(5): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 283 (4.17), 340 (3.22), 361 (3.25), 531 (3.58); 0.01% HCl-MeOH: 283 (4.22), 336 (3.56), 382 (3.65), 531 (4.45);  $AlCl_3$ -MeOH: 286 (4.09), 313 (3.89), 409 (3.71), 570 (4.52)。

色素(10): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 282 (4.12), 333 (3.26), 530 (4.27); 0.01% HCl-MeOH: 282 (4.19), 332 (3.40), 530 (4.42);  $AlCl_3$ -MeOH: 287 sh (4.00), 313 (3.82), 409 (3.57), 570 (4.50)。

色素(11): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 285 (4.39), 313 sh (4.22), 534 (4.38); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.41), 311 (4.23), 534 (4.48);  $AlCl_3$ -MeOH: 289 (4.32), 311 (4.31), 405 (3.80), 574 (4.57)。

色素(12): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 285 (4.22), 308 sh (4.12), 535 (3.36); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.24), 312 (4.12), 531 (4.25);  $AlCl_3$ -MeOH: 290 (4.18), 313 (4.20), 407 (3.46), 571 (4.33)。

色素(13): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 285 (4.30), 330 (4.12), 532 (3.40); 0.01% HCl-MeOH: 284 (4.32), 331 (4.18), 531 (4.40);  $AlCl_3$ -MeOH: 289 (4.12), 315 (4.12), 355 (4.18), 567 (4.48)。

色素(14): 赤色無晶形粉末、UV-vis  $\lambda_{max}$  MeOH (nm) (log): 283 (4.10), 347 (3.29), 550 (2.99); 0.01% HCl-MeOH: 283 (4.14), 335 (3.55), 381 (3.56), 531 (4.36);  $AlCl_3$ -MeOH: 287 (3.97), 312 (3.79), 403 (3.63), 572 (4.43)。

【0090】

10

20

30

40

50

質量分析計 ( positive-ion Electrospray Ionization-Mass Spectrometer ; ESI-MS ) を用いて、図 4 で示した ( 1 ) ~ ( 5 )、( 10 ) ~ ( 14 ) のアントシアニン色素の質量を測定した。

色素 ( 1 ) : ESI-MS ( m/z ) : 581.37 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>15</sub> 581.41 )。

色素 ( 2 ) : ESI-MS ( m/z ) : 727.37 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>O<sub>17</sub> 727.53 )。

色素 ( 3 ) : ESI-MS ( m/z ) : 727.38 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>O<sub>17</sub> 727.53 )。

色素 ( 4 ) : ESI-MS ( m/z ) : 743.35 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>O<sub>18</sub> 743.53 )。 10

色素 ( 5 ) : ESI-MS ( m/z ) : 623.25 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>O<sub>16</sub> 623.44 )。色素 ( 10 ) : ESI-MS ( m/z ) : 582.22 [ M+H ]<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>15</sub> 581.41 )。

色素 ( 11 ) : ESI-MS ( m/z ) : 727.37 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>O<sub>17</sub> 727.53 )。

色素 ( 12 ) : ESI-MS ( m/z ) : 727.32 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>O<sub>17</sub> 727.53 )。

色素 ( 13 ) : ESI-MS ( m/z ) : 743.48 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>O<sub>18</sub> 743.53 )。 20

色素 ( 14 ) : ESI-MS ( m/z ) : 623.38 M<sup>+</sup> ( Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>O<sub>16</sub> 623.44 )。

以上の結果、理論値と測定値がよく一致した。

#### 【 0091 】

〔実施例 5〕HPLC による各種ツバキの花弁に含まれる色素の分析

( 1 ) トウツバキ ( *C. reliculata* Lindl. ) の分析

トウツバキ ( *C. reliculata* Lindl. ) の花弁 ( 花 ) 0.5 g を採集し、予め準備した抽出溶媒 10 ml で 20 でアントシアニン色素を抽出した。抽出溶媒の組成は、メタノール - ギ酸 - トリフルオロ酢酸 - 水 ( MeOH - HCOOH - CF<sub>3</sub>COOH - H<sub>2</sub>O ) の 70 : 2 : 1 : 27 ( v/v% ) である。抽出液は、ミリポアフィルター ( メッシュは 0.45 μM ) で通導後、下記の HPLC 分析条件にて分析した。その結果を図 5 に示す。色素がよく分離していることが分かる。 30

( HPLC 分析条件 )

HPLC の溶出溶媒としては、A 液として 1.5% リン酸を含む水溶液と、B 液としてリン酸 - ギ酸 - アセトニトリル - テトラヒドロフラン - 水の 1.4 : 19 : 23.8 : 5 : 50.8 の比率で混合した溶液を用い、流速を 1 分間に 0.8 ml、カラムの温度を 40 に保ち、検出波長を 525 nm に設定し、A 液と B 液との比率を 82 : 18 から 30 : 70 の比率で 35 分かけてリニアグラジエント溶出させた。 40

#### 【 0092 】

( 2 ) ピタールツバキ雲南種 ( 西南山茶雲南種、*C. pitardii* var. *yunnanica* ) の分析 40

ピタールツバキ雲南種 ( 西南山茶雲南種、*C. pitardii* var. *yunnanica* ) の花弁 ( 花 ) 0.5 g を採集し、予め準備した抽出溶媒 10 ml で 20 でアントシアニン色素を抽出した。抽出溶媒の組成は、メタノール - ギ酸 - トリフルオロ酢酸 - 水 ( MeOH - HCOOH - CF<sub>3</sub>COOH - H<sub>2</sub>O ) の 70 : 2 : 1 : 27 ( v/v% ) である。抽出液は、ミリポアフィルター ( メッシュは 0.45 μM ) で通導後、前記 HPLC 条件にて分析した。その結果を図 6 に示す。色素がよく分離していることが分かる。また、トウツバキ ( *C. reliculata* Lindl. ) の花弁 ( 花 ) から得られたアントシアニン色素組成と類似しているが、両者の HPLC 分析のデータによる品 50



種識別は可能であると考える。

【0093】

(3) ホンコンツバキ (*C. hongkongensis* Seem.) の分析

ホンコンツバキ (*C. hongkongensis* Seem.) の花弁 (花) 0.5 g を採集し、予め準備した抽出溶媒 10 ml で 20 でアントシアニン色素を抽出した。抽出溶媒の組成は、メタノール - ギ酸 - トリフルオロ酢酸 - 水 ( $\text{MeOH} - \text{HCOOH} - \text{CF}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$ ) の 70 : 2 : 1 : 27 (v/v%) である。抽出液は、ミリポアフィルター (メッシュは 0.45  $\mu\text{M}$ ) で通導後、前記 HPLC 条件にて分析した。その結果を図 7 に示す。色素がよく分離していることが分かる。

【0094】

(4) ヤブツバキ (*C. japonica*) の分析

ヤブツバキ (*C. japonica*) の花弁 (花) 0.5 g を採集し、予め準備した抽出溶媒 10 ml で 20 でアントシアニン色素を抽出した。抽出溶媒の組成は、メタノール - ギ酸 - トリフルオロ酢酸 - 水 ( $\text{MeOH} - \text{HCOOH} - \text{CF}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$ ) の 70 : 2 : 1 : 27 (v/v%) である。抽出液は、ミリポアフィルター (メッシュは 0.45  $\mu\text{M}$ ) で通導後、前記 HPLC 条件にて分析した。その結果を図 8 に示す。色素がよく分離していることが分かる。また、ホンコンツバキ (*C. hongkongensis*) の花弁 (花) から得られたアントシアニン色素組成とは違い、デルフィニジン (*delphinidin*) 系の配糖体が認められないことが分かる。

【0095】

(5) サルウィンツバキ (*C. saluenensis* Stapf ex Heam) の分析

サルウィンツバキ (*C. saluenensis* Stapf ex Heam) の花弁 (花) 2.5 g を採集し、予め準備した抽出溶媒 10 ml で 20 でアントシアニン色素を抽出した。抽出溶媒の組成は、メタノール - ギ酸 - トリフルオロ酢酸 - 水 ( $\text{MeOH} - \text{HCOOH} - \text{CF}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$ ) の 70 : 2 : 1 : 27 (v/v%) である。抽出液は、ミリポアフィルター (メッシュは 0.45  $\mu\text{M}$ ) で通導後、前記 HPLC 条件にて分析した。その結果を図 9 に示す。色素がよく分離していることが分かる。

【0096】

(6) ピタルツバキピタル種 (西南山茶西南種、*C. pitardii* var. *pitardii*) の分析

ピタルツバキピタル種 (西南山茶西南種、*C. pitardii* var. *pitardii*) の花弁 (花) 0.5 g を採集し、予め準備した抽出溶媒 10 ml で 20 でアントシアニン色素を抽出した。抽出溶媒の組成は、メタノール - ギ酸 - トリフルオロ酢酸 - 水 ( $\text{MeOH} - \text{HCOOH} - \text{CF}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$ ) の 70 : 2 : 1 : 27 (v/v%) である。抽出液は、ミリポアフィルター (メッシュは 0.45  $\mu\text{M}$ ) で通導後、前記 HPLC 条件にて分析した。その結果を図 10 に示す。色素がよく分離していることが分かる。また、サルウィンツバキ (*C. saluenensis* Stapf ex Heam) の花弁 (花) から得られたアントシアニン色素組成と類似しているが、両者の HPLC 分析データによる品種識別は可能であると考える。

【0097】

(7) 園芸品種ツバキ：大理茶 (*Dalicha*) の分析

園芸品種ツバキ：大理茶 (*Dalicha*) の花弁 (花) 0.25 g を採集し、予め準備した抽出溶媒 10 ml で 20 でアントシアニン色素を抽出した。抽出溶媒の組成は、メタノール - ギ酸 - トリフルオロ酢酸 - 水 ( $\text{MeOH} - \text{HCOOH} - \text{CF}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$ ) の 70 : 2 : 1 : 27 (v/v%) である。抽出液は、ミリポアフィルター (メッシュは 0.45  $\mu\text{M}$ ) で通導後、前記 HPLC 条件にて分析した。その結果を図 11 に示す。色素がよく分離していることが分かる。

【0098】

〔実施例 6〕ツバキ花弁より抽出した抽出エキス、及び単離・精製したアントシアニン色

10

20

30

40

50

## 素の生物活性試験

## (1) アントシアニンサンプルの調製

実施例2と同様に、ホンコンツバキの花弁からアントシアニンを抽出した。採集した花弁8kgに直接、酢酸とメタノールを1対1で混合した溶液(50%酢酸-メタノール)20Lを加え、20-25℃でアントシアニン色素を抽出した。抽出液を綿栓でろ過した後、溶媒を減圧下、ロータリーエバポレーターで留去した。抽出残渣を5%酢酸水溶液に溶解し、オープンカラムクロマトグラフィーに付した。オープンカラムクロマトグラフィーの条件は、固定相にエムシーアイゲルCHP-20P(MCI gel CHP-20P、三菱化学株式会社、Mitsubishi Chemical Corporation)、移動相にA液として5%酢酸水溶液、B液として5%酢酸-メタノールを用い、A液からB液の含量を10%ずつ増やすことによって、MCI gelのカラム(以下MCIカラム)クロマトグラフィーを行い、6つの分画を得た。

10

## 【0099】

DPPHラジカル消去能とヒト白血病細胞増殖抑制作用の実験に用いたサンプル名とサンプル量は以下の通りである。ツバキ花弁の抽出エキス(抽出溶媒を留去した原液)は855.7mg、分画1は0.84g、分画2は0.23g、分画3は0.20g、分画4は106.7mg、分画5は101.2mg、分画6は103.4mgであった。

## 【0100】

また、これらの分画の他に、精製したアントシアニン類を実験に供試した。それらのアントシアニンの種類と供試量は以下の通りである。cyanidin 3-O-glucopyranoside(6)は21.3mg、cyanidin 3,5-di-O-glucopyranoside(23)は21.2mg、cyanidin 3-O-(6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside(8)は22.7mg、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl)-glucopyranoside(1)は20.2mg、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-glucopyranoside(3)は15.5mg、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl-6-O-(E)-p-coumaroyl)-galactopyranoside(12)は15.3mg、を供試した。

20

30

## 【0101】

## (2) DPPHラジカル消去能の実験方法

抗酸化作用の実験は、以下の文献に記載の方法を用いて行った(Harwat, K. S. M. et al, Free Radical Res., 36:177-187, 2002)。

## 【0102】

サンプルは、前記(1)で得られた6つの粗製分画物と抽出エキス及び6種のアントシアニンをそれぞれ20から160µg/ml以下の濃度で調整したものを順次半等分に希釈して用いた。

## 【0103】

これらのサンプルを平底のプレート(96well)に加え、更にDPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl、マイクロモラーの濃度で調整したものを)を190µl加え、10秒間混合した後、遮光して30分間放置した。この反応後、各ウエルの反応溶液を、490nmの波長の吸光度を用いてマイクロプレートリーダーで測定し、その吸光度の値からTroloxの吸光度標準曲線を用いてTrolox濃度を換算した。その換算値より、Troloxのラジカル消去能標準曲線からラジカル消去率を算出した。

40

## 【0104】

DPPHラジカル消去能の結果を表16に示した。アントシアニンでは、cyanidin 3-O-glucopyranoside(6)が最も強い抗酸化作用を示す

50

ことが分かる。続いて、cyanidin 3,5-di-O-glucopyranoside (23) が強い抗酸化作用を示した。

【0105】

【表16】

サンプル	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
Cy3G (6)	8.2
Cy3G5G (23)	10.0
Cy3GEPc (8)	13.2
Cy3GX (1)	14.8
Cy3GXEPc (3)	37.9
Cy3GaXEPc (12)	>160.0

10

【0106】

DPPHラジカル消去能の結果を表17に示した。分画では、分画3が最も強い抗酸化作用を示し、続いて、分画4、分画5の順で強い抗酸化活性を示した。このように、ツバキの抽出エキスのみならず、分画が強い活性を示したことから、ツバキ花卉のエキスが抗酸化作用に有効であることが分かった。

【0107】

【表17】

20

サンプル	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
分画3	9.9
分画4	10.9
分画5	11.4
分画2	12.4
エキス	38.9
分画1	95.6
分画6	123.0

30

【0108】

(3) ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60細胞) に対する抑制効果を見るための実験方法

HL-60細胞増殖抑制作用の実験は、特開2005-075790号公報に記載の方法を用いて行った。

【0109】

[ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60細胞) の調製]

RPMI 1640 (10% FBS+) 培地の作成:

40

RPMI 1640を2.04g秤取し、蒸留水にて全量を200mlとし、攪拌して溶解した後、溶液をオートクレーブで滅菌した(121、20分)。冷却後、これに、10%炭酸水素ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>) を4ml、FBS (予め非動化したもの) を20ml、抗生物質溶液 (ペニシリン・ストレプトマイシン) 2mlを加え、4℃で保存した。

【0110】

HL-60細胞の融解と増殖:

-80℃で保管しておいたHL-60細胞を37℃で溶解し、予め37℃で保温したRPMI 1640 (10% FBS+) 培地5mlに混入し、よく混合した。培地は、遠心分離 (1200rpm、5分間) を行った後、上澄みを除去した。これにRPMI 1640

50

(10% FBS+) 培地 1 ml を加え、軽く攪拌し、更に RMP I 1640 (10% FBS+) 培地 5 ml を加え、混合した後、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) を行い、上澄みを除去した。これに RMP I 1640 (10% FBS+) 培地 1 ml を加え、軽く攪拌し、更に RMP I 1640 (10% FBS+) 培地 5 ml を加え、混合した後、シャーレ (6 cm) に培地を入れ、5% 二酸化炭素含有大気中 37 の条件で、インキュベーターで HL - 60 細胞を培養した。

#### 【0111】

HL - 60 細胞の継代：

培養し、増殖された HL - 60 細胞を 15 ml チューブで回収し、丁寧に攪拌した後、その少量を血球計算盤に採取し、細胞数をカウントした。15 ml チューブで回収した HL - 60 細胞は、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) を行った後、上澄みを除去した。これに予め 37 で保温した RMP I 1640 (10% FBS+) 培地 1 ml を加え、軽く攪拌し、先の細胞数を計算した値から、培地中の細胞の濃度が  $2 \times 10^6$  cells / 6 ml となるように、RMP I 1640 (10% FBS+) 培地で濃度を調整した。調整した培地は、5% 二酸化炭素含有大気中 37 の条件で、インキュベーターで HL - 60 細胞を継代した。

10

#### 【0112】

HL - 60 細胞の保存：

継代された HL - 60 細胞を 15 ml チューブで回収し、丁寧に攪拌した後、その少量を血球計算盤に採取し、細胞数をカウントした。15 ml チューブで回収した HL - 60 細胞は、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) を行った後、上澄みを除去した。これに予め 37 で保温した RMP I 1640 (10% FBS+) 培地 1 ml を加え、軽く攪拌し、先の細胞数を計算した値から、培地中の細胞の濃度が  $2 \times 10^6$  cells / 1 ml となるように、RMP I 1640 (10% FBS+) 培地を 80%、FBS を 10%、ジメチルスルホキシド (DMSO) を 10% の組成を有する培地で、濃度を調整した。これをセラムチューブに 1 ml ずつ分注し、-20 で一夜保存後、翌日より -80 にて保存した。

20

#### 【0113】

[細胞増殖抑制実験 (MTT assay) ; HL - 60 細胞の 50% 生存率の検定方法]

30

本法は、文献記載の方法を参考にした (Mosmann, T. : J. Immunol. Methods, 65 : 55 - 63, 1983)。  $2 \times 10^6$  cells / ml の RMP I 1640 (10% FBS+) 培地で継代した HL - 60 細胞を、平底の 96 well のプレート 1 well あたり  $2 \times 10^4$  cells / 100  $\mu$ l の HL - 60 細胞数になるように培地で RMP I 1640 (10% FBS+) 培地で希釈し、  $2 \times 10^4$  cells / 100  $\mu$ l の HL - 60 細胞を各 well へ分注した。これを 5% 二酸化炭素含有大気中 37 の条件で、インキュベーターで 24 時間培養した。

#### 【0114】

培養後各 well に、各アントシアニン及び分画の濃度が 0、50、100、200、400 マイクログラム / ml の濃度になるように、また、各 well の培地量が全量で 110  $\mu$ l となるように添加した。添加後、プレート毎に規定した時間について、5% 二酸化炭素含有大気中 37 の条件下、インキュベーターで 48 時間培養した。

40

#### 【0115】

培養後、各 well に MTT 溶液 (3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2, 5 - ジフェニル テトラゾリウム ブロミド ; 3 - (4, 5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2, 5 - diphenyl tetrazolium bromide、MTT、の 150 mg を PBS の 30 ml に溶解したものを) を 10  $\mu$ l ずつ分注した。プレート毎に 4 時間、5% 二酸化炭素含有大気中 37 の条件下、インキュベーターで培養した。培養終了後、各 well に 0.04 N HCl - イソプロパノール (isopropanol) 溶液を 100  $\mu$ l ずつ分注した。室温で 10 分間放置した後、マ

50

マイクロプレートリーダーのマルチラベルカウンター（595nm）で吸光度を測定した。細胞生存率（%）は、アントシアニン又は分画を添加していない（コントロール細胞の）吸光度から各アントシアニン又は分画の吸光度を引いたものを、コントロール細胞の吸光度で割った値に100を乗じて算出した。

## 【0116】

ヒト急性前骨髄性白血病細胞（HL-60細胞）に対する抑制効果の結果を表18に示した。アントシアニンでは、cyanidin 3,5-di-O-glucopyranoside (23) が最も強いHL-60細胞の増殖抑制活性を示した。続いて、cyanidin 3-O-(2-O-xylopyranosyl)-glucopyranoside (1) が強いHL-60細胞の増殖抑制活性を示した。このように、ツバキ花弁由来のアントシアニン色素がHL-60細胞の増殖抑制に有効であることが分かった。

10

## 【0117】

## 【表18】

サンプル	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
Cy3G (6)	287.1
Cy3G5G (23)	216.7
Cy3GEPc (8)	362.2
Cy3GX (1)	261.3
Cy3GXEPc (3)	>400
Cy3GaXEPc (12)	>400

20

## 【0118】

ヒト急性前骨髄性白血病細胞（HL-60細胞）に対する抑制効果の結果を表19に示した。分画では、分画5が最も強いHL-60細胞の増殖抑制活性を示し、続いて、分画3、分画2、分画4の順で強いHL-60細胞の増殖抑制活性を示した。このように、ツバキ花弁抽出エキス分画が強い活性を示したことから、ツバキ花弁のエキスがHL-60細胞の増殖抑制に有効であることが分かった。

30

## 【0119】

## 【表19】

サンプル	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
分画3	91.2
分画4	119.1
分画5	83.9
分画2	109.9
エキス	>200
分画1	>400
分画6	>400

40

## 【産業上の利用可能性】

## 【0120】

本発明のアントシアニン色素は、飲食品、医薬品、化粧品の添加剤として有用である。本発明のツバキの色素による品種識別方法は、ツバキの品種を決定する方法として利用することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0121】

【図1】実施例1においてトウツバキ（*C. reliculata* Lindl.）の花

50

弁より単離されたアントシアニン類の詳細な構造を示す図である。

【図2】実施例2においてホンコンツバキ (*C. hongkongensis* Seem.) の花弁より単離されたアントシアニン類の詳細な構造を示す図である。

【図3】実施例3においてサルウィンツバキ (*C. saluenensis* Stapf ex Heam) の花弁より単離されたアントシアニン類の詳細な構造を示す図である。

【図4】実施例4において園芸品種ツバキ：大理茶 (*Dalicha*) の花弁より単離されたアントシアニン類の詳細な構造を示す図である。

【図5】実施例5においてトウツバキ (*C. reliculata* Lindl.) の花弁より抽出された粗抽出物中のアントシアニン色素を調べた結果を示す図である。

【図6】実施例5においてピタルツバキ雲南種 (西南山茶雲南種、*C. pitardii* var. *yunnanica*) の花弁より抽出された粗抽出物中のアントシアニン色素を調べた結果を示す図である。

【図7】実施例5においてホンコンツバキ (*C. hongkongensis* Seem.) の花弁より抽出された粗抽出物中のアントシアニン色素を調べた結果を示す図である。

【図8】実施例5においてヤブツバキ (*C. japonica*) の花弁より抽出された粗抽出物中のアントシアニン色素を調べた結果を示す図である。

【図9】実施例5においてサルウィンツバキ (*C. saluenensis* Stapf ex Heam) の花弁より抽出された粗抽出物中のアントシアニン色素を調べた結果を示す図である。

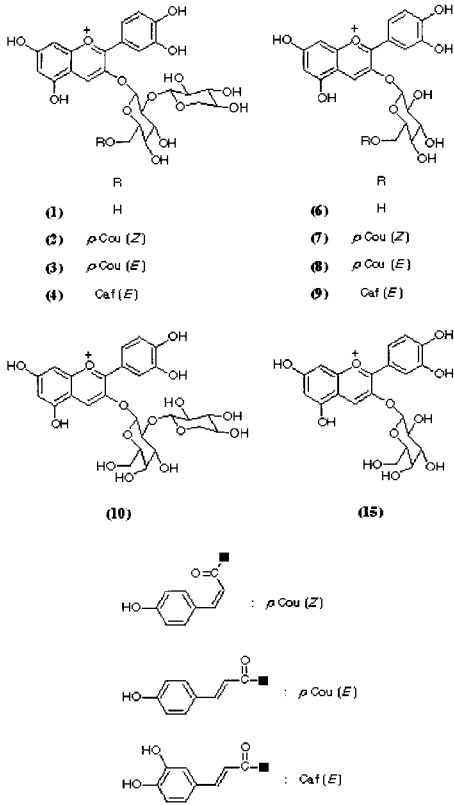
【図10】実施例5においてピタルツバキピタル種 (西南山茶西南種、*C. pitardii* var. *pitardii*) の花弁より抽出された粗抽出物中のアントシアニン色素を調べた結果を示す図である。

【図11】実施例5において園芸品種ツバキ：大理茶 (*Dalicha*) の花弁より抽出された粗抽出物中のアントシアニン色素を調べた結果を示す図である。

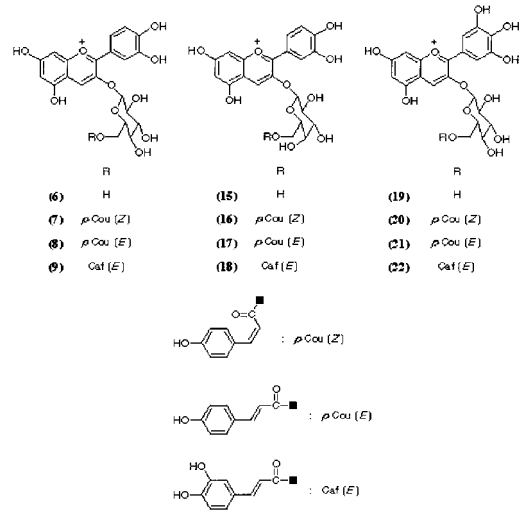
10

20

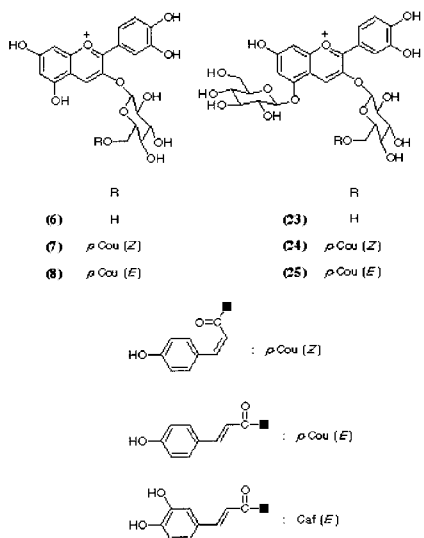
【 図 1 】



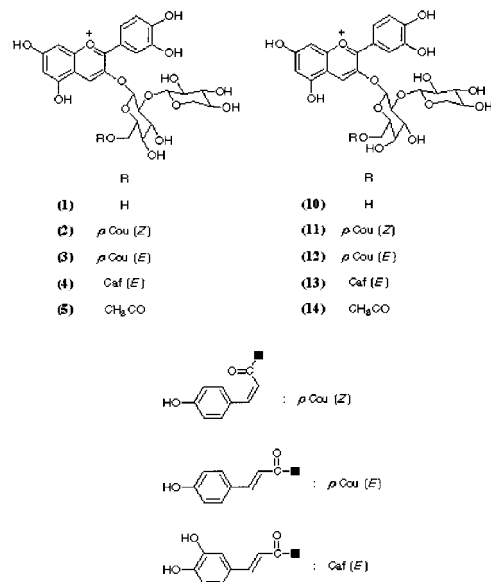
【 図 2 】



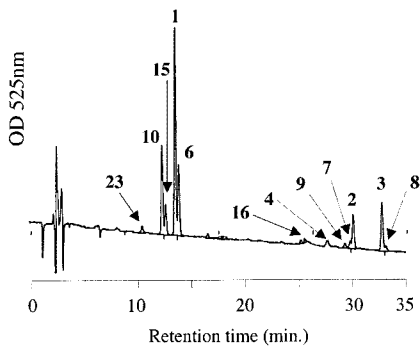
【 図 3 】



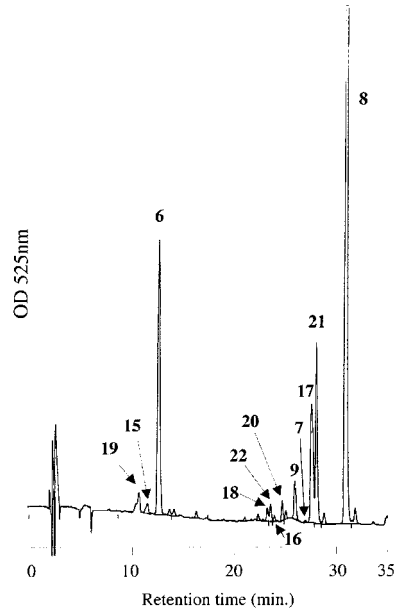
【 図 4 】



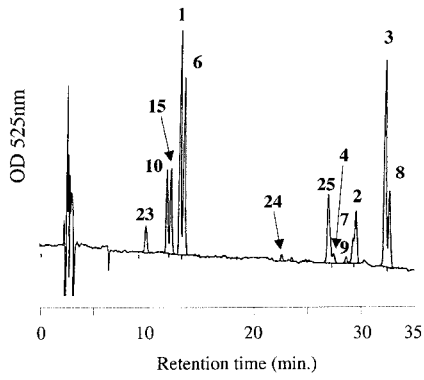
【 図 5 】



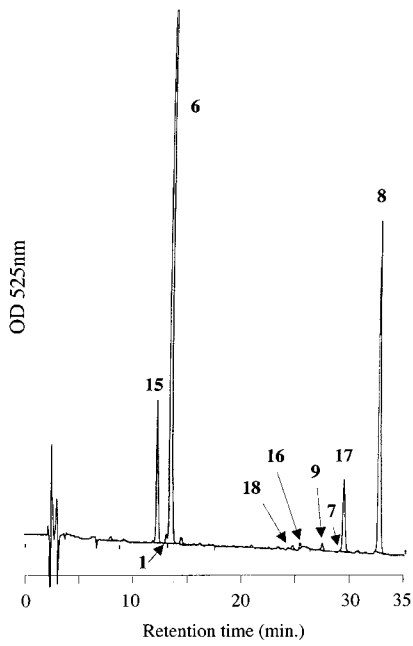
【 図 7 】



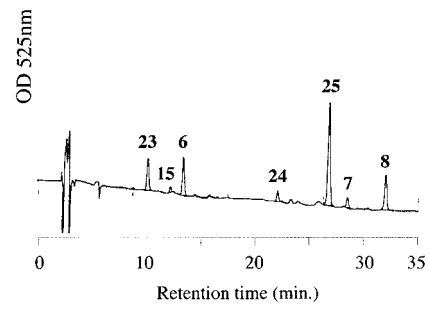
【 図 6 】



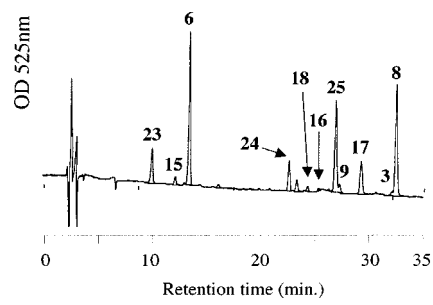
【 図 8 】



【 図 9 】

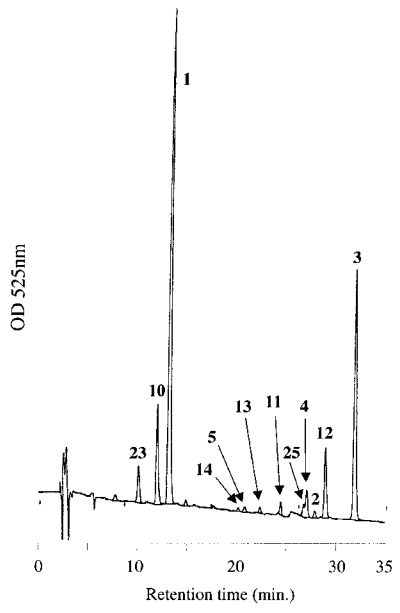


【 図 10 】





【 図 1 1 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 李 建賓

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内

(72)発明者 坂田 祐介

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内

(72)発明者 侯 徳興

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内

Fターム(参考) 4C057 AA06 AA11 BB03 DD01 KK07

4C086 AA01 AA03 AA04 EA11 NA14 ZB26 ZC52

4C088 AB45 AC03 BA10 BA14 BA23 BA32 CA14 NA14 ZB26 ZC52