

## ヒメヒオオギズイセン (*Crocoshmia × crocosmiiflora*) の 花被におけるアントシアニンとその他の色素成分 —顕微分光法による判別および同定\*

大谷俊二\*\*・伊藤 勉\*\*\*・岩科 司\*\*\*\*

OOTANI, Shunji\*\*, Tsutomu ITO\*\*\* and Tsukasa IWASHINA\*\*\*\*: Identification  
of Anthocyanin and Other Pigments, and Their Distribution in the Perianth  
Tissues of a Cultivar, *Crocoshmia × crocosmiiflora* (Iridaceae)

ヒメヒオオギズイセン *Crocoshmia × crocosmiiflora* (Lemoine ex Morr.) N.E. Br. はトリトニア (*Tritonia*) と呼ばれ、初夏から盛夏にかけて橙黄色の花を次々と咲かせるアヤメ科の植物である。この植物は南アフリカ原産の *Crocoshmia aurea* (Pappe) Planch. と *C. pottsii* (Bak.) N.E. Br. との交雑によってヨーロッパで作出された園芸植物であるが、明治の中期にわが国に渡来し、現在では広く庭園植物として栽植されるほか、暖地では林地の周縁部などに野生化しているものも見られる (長田 1976)。

この花の主要色素はクロッカス *Crocus candidus* Clarke やフリージア *Freesia refracta* Klatt などの花被に含まれている水溶性カロチノイドである crocin (crocetin digentiobioside, Fig. 1) やその他の crocetin の配糖体であることはすでに報告した (大谷・林 1982)。また、アントシアニン色素として若干の cyanidin 配糖体も含まれ、花色が crocetin 配糖体 (主に crocin) と cyanidin 配糖体によって発現していることは顕微分光光度法などによって明らかにされている (岩科ら 1983)。

今回は、このアントシアニンの配糖体およびその結合様式を解明するとともにこれに随伴する他のフラボノイド色素の分離・同定を行ない、さらにアントシアニンと crocetin 配糖体との花被の組織細胞における分布を顕微分光光度法によって確認した。

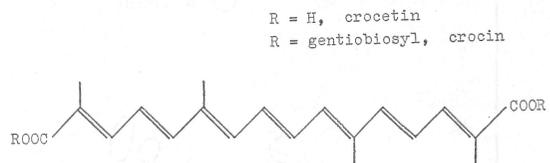


Fig. 1. Structures of crocetin and crocin.

### 材料および方法

材料 実験に用いた材料は(財)進化生物学研究所で長年系統維持し、株分けによって増殖された *Crocoshmia × crocosmiiflora* (Lemoine ex Morr.) N.E. Br. [= *Tritonia × crocosmiiflora* (Lemoine ex Morr.) Nichols, または *Montbretia × crocosmiiflora* Lemoine ex Morr.] の新鮮な橙黄色の花

\* Contribution from the Research Institute of Evolutionary Biology, No. 77. \*\* (財)進化生物学研究所, 〒158 東京都世田谷区上用賀 The Research Institute of Evolutionary Biology, Tokyo 158.  
\*\*\* 東京農業大学農学部育種学研究室, 〒156 東京都世田谷区桜ヶ丘 Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156. \*\*\*\* 国立科学博物館 筑波実験植物園 Tsukuba Botanical Garden, National Science Museum, Ibaraki Prefecture 305.

被である。

**方法 色素の分離・精製:** アントシアニン色素については1%メタノール性塩酸で抽出を行ない、展開溶剤 BAW, 1%HCl および BuH (Table 1 参照) によるマス-ペーパークロマトグラフ (mass-PC) 法によって精製した。他のフラボノイド成分についてはメタノールで抽出し、ポリアミド (polyamide C-200, 和光純薬工業) のカラム (内径 4.5×高さ 30 cm) にかけて後、各フラクションを mass-PC (展開溶剤 15%AcOH, 次に BAW) で展開し、それぞれのバンドから得られた各色素溶液をセファデックス LH-20 のカラム (内径 1×高さ 15 cm) にかけて純化した。なお、mass-PC はいずれも東洋汙紙 No. 50 を用いて上昇法によって行なった。

**色素の同定:** アントシアニン色素の定性については主に林・武田 (1980) の方法に従って行ない、他のフラボノイドについてはペーパークロマトグラフィ (PC) や紫外・可視吸収スペクトルを適用して岩科ら (1984) に従って行なった。

**吸収スペクトルの測定:** 成分色素の紫外・可視吸収スペクトルについては日立自記分光光度計 EPS-3T 型を用いて Mabry *et al.* (1970), Markham (1982) および林ら (1984) に従って、また花被片の細胞内色素の検出における顕微分光光度法についてはオリンパス MMSP-TU 型マルチ測光顕微鏡を用いて岩科ら (1983) に従って測定した。

## 結果および考察

### (1) 色素の分離

**アントシアニンの分離:** *C. × crocosmiflora* の新鮮花被 265 g を 1% メタノール性塩酸で冷浸し、汙過後、減圧下 30°C で濃縮した。この濃縮液を展開溶剤 BAW, 1%HCl および BuH (Table 1 参照) で PC すると単一のアントシアニンスポット (それぞれ Rf 値 0.34, 0.20 および 0.57) が得られる。そこで展開溶剤 BuH で mass-PC して風乾後、相当するアントシアニンバンドを切り抜き、5% 酢酸酸性メタノールで溶離した。次に、このアントシアニン溶液を展開溶剤 1% HCl で再度 mass-PC し、同様の方法で溶離してアントシアニンを精製した。

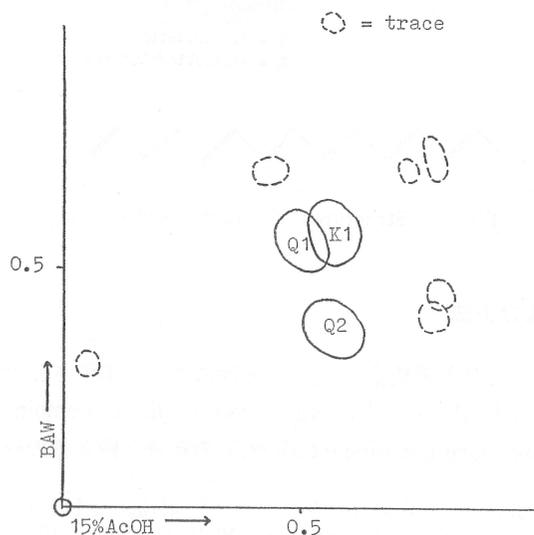


Fig. 2. Two-dimensional chromatogram of methanol extract from the perianths of *C. × crocosmiflora*.

**フラボノイドの分離:** 新鮮花被 147 g をメタノールで冷浸し、減圧下で少量に濃縮する。この濃縮水溶液を石油エーテルで洗った後に二次元 PC (第一次—BAW, 第二次—15% AcOH) にかけると 3 個のスポット K1, Q1 および Q2 が出現する。(なお、これら以外にも UV 下で暗紫色ないしは黄色を示すスポットも認められるが、非常に微量なために今回は精査しなかった, Fig. 2 参照)。これらの色素成分を含む溶液を濃縮乾涸後、30% メタノールに溶かし、ポリアミドカラムの頂部におき、30% メタノールから徐々にメタノールの濃度勾配を高めて展開し、20 ml 容量で合計 220 のフラクション (Fr) を得た。

各 Fr を PC (BAW と 15%AcOH) で調査したところ、K1 と Q1 が Fr 51~151 に、Q2 が Fr 178~218 に認められた。前者の

Fr については少量に濃縮後、展開溶剤 15%AcOH, 続いて BAW での mass-PC にあて、K1 と Q1 とを分離した。このようにして得られた K1, Q1 および Q2 のそれぞれの溶液をセファデックス LH-20 カラム (展開溶剤—70%メタノール) に通して、最終的な精製を行なった。

## (2) 色素の同定

アントシアニンの同定：花被片に含まれる唯一のアントシアニンの酸加水分解によって得られるアグリコンは cyanidin と同定され (Table 1), また糖成分としては rhamnose と glucose が検出された。これらの糖の結合位置は、もとのアントシアニンの 1%メタノール性塩酸による吸収スペクトルの  $E_{440}/E_{max}$  値が約 19% である点から、ともに 3-位であると推定され (安田 1973), さらに糖の分子数についても部分加水分解の中間産物がただ 1 種類だけであることから, glucose と rhamnose は二糖体として 3-位に結合していることが判明した (Fig. 3)。また中間産物が chrysanthememin (cyanidin 3-O-glucoside) であったことから, アグリコンに直接結合しているのは, rhamnose でなくて glucose である。以上の事実から, このアントシアニンを cyanidin 3-O-rhamnosylglucoside と推定して, 相当する構造をもつ基準標品の keracyanin とクロマ

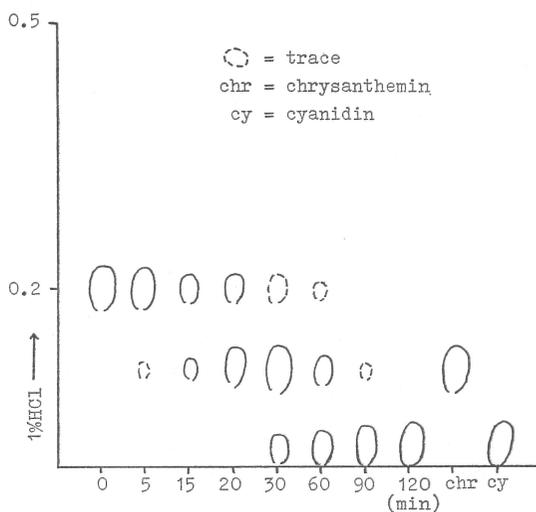


Fig. 3. Paper chromatogram showing partial hydrolysis of anthocyanin in the perianths of *C. x crocosmiflora*.

Table 1. Chromatographic data of anthocyanin, its partially hydrolyzed product and aglycone in the perianths of *C. x crocosmiflora*

Anthocyanins	Rf values					
	BuH	BAW	B2NH	1%HCl	Forestal	FAH
<i>Crocsmia</i> anthocyanin	0.57	0.34	0.33	0.20	—	—
Partially hydrolyzed anthocyanin	0.62	0.40	0.40	0.11	—	—
Anthocyanidin	0.85	—	—	—	0.53	0.32
Authentic specimens;						
keracyanin	0.57	0.34	0.33	0.20	—	—
chrysanthememin	0.62	0.40	0.40	0.11	—	—
cyanidin	0.86	—	—	—	0.55	0.32
pelargonidin	0.93	—	—	—	0.69	0.42
delphinidin	0.55	—	—	—	0.35	0.20
peonidin	0.88	—	—	—	0.70	0.41
malvidin	0.66	—	—	—	0.64	0.33

Solvent systems: BuH=n-BuOH/conc. HCl/H<sub>2</sub>O (7:2:5, upper phase), BAW=n-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (4:1:5, upper phase), 1%HCl=H<sub>2</sub>O/conc. HCl (97:3), Forestal=AcOH/conc. HCl/H<sub>2</sub>O (30:3:10), FAH=Formic acid/AcOH/H<sub>2</sub>O (5:2:3), B2NH=n-BuOH/2N HCl (1:1, upper phase).

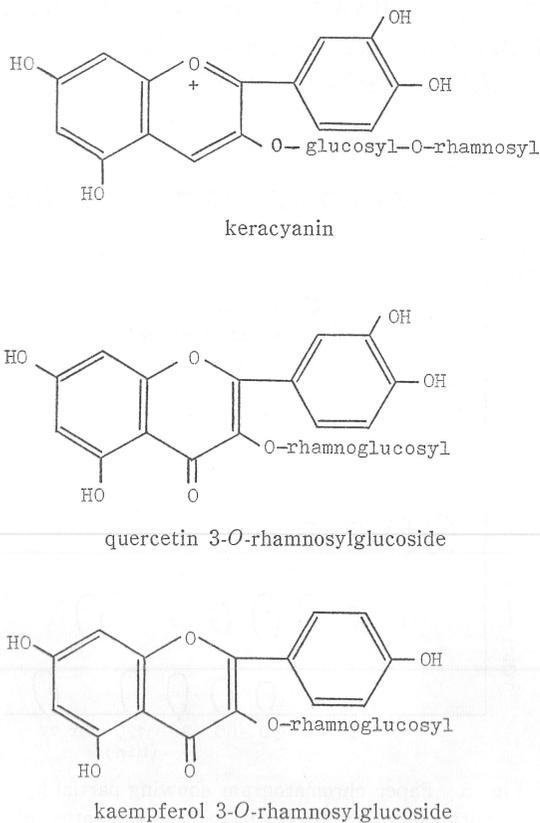


Fig. 4. Structures of flavonoids in *C. × crocosmiflora*.

Table 2. Chromatographic data of flavonoids and their aglycones in the perianths of *C. × crocosmiflora*

Flavonoids	Rf values				Colors	
	BAW	TBA	BEW	15% AcOH	UV	UV/NH <sub>3</sub>
Glycosides						
K1	0.58	—	—	0.56	dark purple	dark yellow
Q1	0.57	0.51	0.44	0.51	dark purple	yellow
Q2	0.39	—	—	0.57	dark purple	dark yellow
Aglycones						
K1	0.96	0.82	0.92	0.03	yellow	yellow
Q1	0.83	0.60	0.75	0.01	bright yellow	bright yellow
Authentic specimens;						
rutin	0.57	0.51	0.44	0.51	dark purple	yellow
kaempferol	0.94	0.81	0.92	0.03	yellow	yellow
quercetin	0.83	0.60	0.75	0.01	bright yellow	bright yellow

Solvent systems: TBA = t-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (3:1:1), BEW = n-BuOH/EtOH/H<sub>2</sub>O (4:1:2.2), 15% AcOH = AcOH/H<sub>2</sub>O (15:85), BAW = (see, Table 1).

トグラム上で比較を行なったところ、両者の性質は一致し、*C. × crocosmiflora*の花被に含まれる唯一のアントシアニンは cyanidin 3-O-rhamnosylglucoside (keracyanin) と同定された (Fig. 4)。なお最近、同属の *C. masonii* の花被から cyanidin 配糖体 (3,5-diglucoside と 3-rutinoside-5-glucoside) の存在も報告されている (Williams *et al.* 1986)。

フラボノイドの同定: K1 (kaempferol 3-O-rhamnosylglucoside)。この物質の各種試薬の添加による吸収スペクトルの移動は、このフラボノイドが 5, 7, 4'-triOH 型のフラボノールであることを示した (Table 3, Mabry *et al.* 1970, Markham 1982 および林ら 1984)。また、加水分解によって得られたアグリコンは kaempferol と同定され (Table 2)、水解母液からは glucose および rhamnose が検出された。さらに展開溶剤 15% AcOH による PC の Rf 値 (0.56) から結合糖は合計 2 分子と考えられる。

以上の点から、この配糖体は kaempferol 3-O-rhamnosylglucoside と同定された。

Q1 (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside)。淡黄色色素 Q1 を酸加水分解して得られるア

Table 3. Major absorption maxima of flavonoids in the perianths of *C. × crocosmiiflora*

Flavonoids	$\lambda$ max. (nm)					
	in	MeOH	+NaOMe	+AlCl <sub>3</sub>	+AlCl <sub>3</sub> /HCl	+NaOAc
K1		267	276	276	276	275
		352	329	306	304	318
			401 ↑	353	349	390
				400	398	
Q1		258	273	276	272	274
		360	310	435	300	330
			410 ↑		368sh	400
					402	
Q2		265	273	277	278	274
		318	312sh	310	318	318
		353	372 ↑	432	400	380

sh=shoulder, ↑=remarkable increase in intensity relative to methanol spectrum.

グリコンは基準標品の quercetin とクロマトグラム上の性質が完全に一致した (Table 2)。すでに quercetin は Williams *et al.* (1986) によって, myricetin とともに葉の成分として同定されているが, 花被の成分としては初めてである。さらに水解母液からは glucose と rhamnose とが検出された。また, もとの配糖体の吸収スペクトルの移動はこの配糖体が 5, 7, 3', 4'-tetraOH 型のフラボノールであることを示している (Table 3)。したがって, rhamnose と glucose はともに 3-位に結合しているを見なければならない。以上の点から, この配糖体が quercetin 3-O-rhamnosylglucoside と推定されたので, 該当するフラボノール配糖体である rutin (quercetin 3-O-rutinoside) の基準標品とクロマトグラム上で比較したところ両者は完全に一致した (Table 2)。

Q2. 淡黄色の色素 Q2 のメタノール溶液中の吸収極大は, この化合物が明らかにフラボノールであることを示しており, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl, NaOMe あるいは NaOAc 添加による吸収極大の移動は 5, 7, 3', 4'-位に遊離水酸基の存在を示している (Table 3)。また, 加水分解によって水解母液からは glucose のみが検出された。以上の点からこの化合物は quercetin タイプのフラボノールの 3-O-glucoside と推定されるが, 従来の quercetin 3-O-glucoside (例えば isoquercitrin, quercetin 3-O-diglucoside など) とは明らかに Rf 値が異なり (Mabry *et al.* 1970), またメタノールによる吸収スペクトルで 318 nm に顕著なピークが出現するなどの特徴を示す。このような位置に吸収極大をもつフラボノールとしては kaempferol 3-O-(*p*-coumaroyl)-glucoside (317 nm), kaempferol 3-O-(*p*-coumaroyl)-rutinoside-7-O-glucoside (320 nm) など芳香族の有機酸を結合する多くのアシル化フラボノールの報告がある (Harborne 1964 および Young and Sterner 1981)。実際に, アヤメ科の *Nivenia fruticosa* (L. f.) Baker や *Patersonia fragilis* (Labill.) Asch. & Graebn. からは quercetin のアシル化型の存在が指摘されている (Williams *et al.* 1986)。しかしながら, 今回はフラボノール Q2 の収量が僅少であったために完全な同定には至らなかった。

### (3) 花被片内における花色色素の所在

*C. × crocosmiiflora* の橙黄色花被には, 今回検出・同定されたアントシアニンとフラボノールの他に花の主要色素として水溶性カロチノイドである crocetin 配糖体が知られており (大谷・林1982), 花色が crocetin 配糖体とアントシアニンの両色素の存在にもとづくことも顕微分光光度法による細

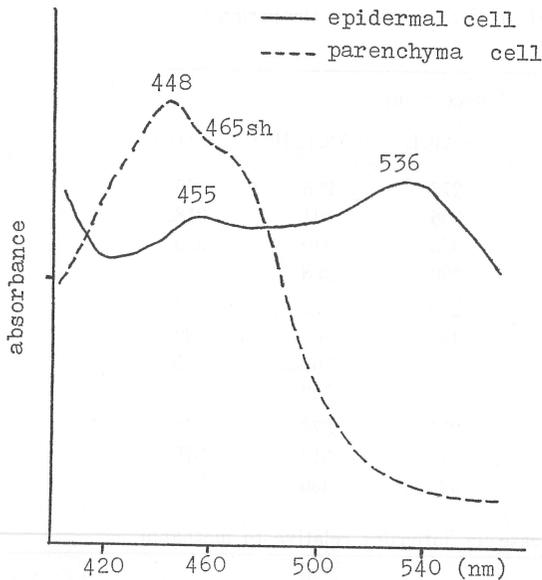


Fig. 5. Spectral curves of living cells in the perianths of *C. x crocosmiiflora*.

胞内色素の光吸収特性から解析されている(岩科ら 1983)。今回、花被片の表皮細胞と柔細胞とについて、さらに詳しく顕微分光スペクトルを測定したところ、Fig. 5 に示したような結果を得た。すなわち、生体内のアントシアニンは、他の多くの植物の花被と同様に、上面の表皮細胞に存在するが(536 nm の吸収ピークの出現による)、これに対して、crocetin 配糖体は表皮およびその内側の柔細胞のいずれにも含まれる(450 nm 前後の吸収ピークの出現による、岩科ら 1983)。したがって、花被の組織では水溶性カロチノイド(crocetin の配糖体)は表皮および柔組織の黄色細胞に広く分布しているが、アントシアニン(keracyanin)は一層からなる橙色の上面表皮細胞に局在している。しかもこの表皮細胞には crocetin 配糖体も共存して橙色を呈していることが明らかになった。今後、このよう

な生体内における各種色素の所在をめぐって経時的变化を追跡すれば、あるいは花被組織の分化についての有効な示唆が提供されるかも知れない。

## 謝 辞

本研究の実施にあたって終始便宜を賜った(財)進化生物学研究所理事長近藤典生博士ならびに研究のご指導を頂いた同研究所主任研究員林孝三博士に篤く感謝の意を表す。また、本論文作成にあたって校閲の労を賜った国立科学博物館筑波実験植物園園長黒川道博士にも併せて謝意を表す。

## Summary

In orange yellow perianths of *Crococsmia x crocosmiiflora* (Lemoine ex Morr.) N. E. Br. (Iridaceae), in which crocin (water-soluble glycoside of crocetin) was detected spectrographically as the major pigment (Ootani and Hayashi 1982), flavonoid profile was studied in detail by means of paper-chromatography, spectrophotometry, etc. Among four flavonoid compounds, an anthocyanin was determined as keracyanin (cyanidin 3-O-rhamnosylglucoside) by direct comparison with authentic specimen, and other two flavonoids were identified as 3-O-rhamnosylglucosides of kaempferol and quercetin, respectively. The remaining one was partially qualified as a sort of 3-O-glucoside of quercetin combined with aromatic acid.

In parallel with qualitative analysis of flavonoids as above, microspectrophotometric comparison was made between epidermal and parenchyma cells for detecting the location of crocetin glycosides and anthocyanin (keracyanin) in the perianths. The result has

shown that crocetin glycoside was present in the cell sap of both epidermal and parenchyma cells, while the anthocyanin was only in the former cells. Thus, orange-red color of upper epidermis is displayed by co-existence of keracyanin and crocetin glycoside.

## 文 献

- Harborne, J. B., 1964. Plant polyphenol, XI. The structures of acylated anthocyanins. *Phytochemistry* 3: 151-160.
- 林 孝三・岩科 司・川崎 勝・大谷俊二, 1984. ヒメシヤガ *Iris gracilipes* の花のフラボノイド成分. 進化生研研究報告 2: 75-83.
- 岩科 司・大谷俊二・林 孝三, 1983. 顕微分光光度法による液胞および色素体の吸収スペクトルと含有色素成分の識別とについて. 育種学雑誌 33: 457-467.
- Iwashina, T., S. Ootani and K. Hayashi, 1984. Neochilenin, a new glycoside of 3-O-methylquercetin, and other flavonols in the tepals of *Neochilenia*, *Neoporteria* and *Parodia* species (Cactaceae). *Bot. Mag. Tokyo* 97: 23-30.
- Mabry, T. J., K. R. Markham and M. B. Thomas, 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. 35-61. Springer-Verlag, Berlin.
- Markham, K. R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification. 37-51. Academic Press, London.
- 大谷俊二・林 孝三, 1982. 各種植物の黄色花における水溶性カロチノイドの検索. 進化生研研究報告 1: 71-76.
- 長田武正, 1976. 原色日本帰化植物図鑑. p. 363. 保育社, 大阪.
- 武田幸作・林 孝三, 1980. 赤色系フラボノイド (アントシアニン). 151-174. 林 孝三 (編), 植物色素. 養賢堂, 東京.
- 安田 斉, 1973. 花色の生理・生化学. 33-36. 内田老鶴圃新社, 東京.
- Williams, C. A., J. B. Harborne and P. Goldblatt, 1986. Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family Iridaceae. *Phytochemistry* 25: 2135-2154.
- Young, D. A. and R. W. Sterner, 1981. Acylated kaempferol glycosides from *Aconitum* (Ranunculaceae). *Phytochemistry* 20: 2055-2056.