

化粧紅高品質ベニバナ由来赤色色素の核磁気共鳴装置による分析

佐々木 麻衣子¹ 高橋 圭子^{*2}

Analysis of the high purity and quality red pigment “Beni” isolated from *Carthamus tinctorius* L. for cosmetic rouge taking by nuclear magnetic resonance spectroscopy

Maiko Sasaki^{*1} Keiko Takahashi^{*2}

In order to elucidate molecular structure of carthamin, the global traditional cosmetic red ingredient that has a green metallic luster, the conditions and all natural materials of the traditional extraction and purification method from the fermented safflower petals (*Benimochi*) was chemically analyzed with varied instruments in detail. Carthamin was purified excellent in dispersion stability with sufficient reproducibility. And complete assignment of ¹H and ¹³C-NMR signals on carthamin molecules was achieved.

緒言

ベニバナ (*Carthamus tinctorius* L.) はエチオピアからエジプト付近が原産地とされている。エジプト古代王朝のミイラにはこの花が添えられていた。末期王朝のサッカラの遺跡からはベニバナと精製された口紅が発掘されている。シルクロードの交流が盛んになるにつれ、匈奴を通じて中国、日本にまで渡来した。正倉院文書にもベニバナを示すおびたしい「紅」の文字が記されている¹⁾。古くから薬として重用され、日本薬局方にも「コウカ」として収載されている²⁾。しかし、ベニバナの価値はその色、特に赤、紅(くれない)にある。

ベニバナ花弁は黄色と赤色の色素を含み、白色のキノカルコンから代謝により黄色色素となり、最終的には赤色色素 carthamin (Fig. 1)となる。Carthamin の前駆体 precarthamin は 16 位水素がカルボン酸 (COOH) となっているだけの違いではあるが黄色である。Carthamin が唯一の赤色色素であり、色素全体の 1%にも満たない。希少な天然赤色色素は、中国でも紀元前 2 世紀から高貴な女性の化粧料として用いられた。日本でもベニバナ由来赤色

色素を盃に塗布し、乾燥させ化粧紅として使用された (Fig. 2)。厚く塗り重ねると緑色光沢が表れる紅は「笹紅」あるいは「笹色紅」と呼ばれ、高品質の証であった。この様子は江戸時代の浮世絵でも見ることができる。貴重であるがゆえに carthamin の研究は古くから行われ、1846 年に最初の報告がされている³⁾。多くの有機化学研究者がこれに続いたが結晶化に至らず、非常に不安定で分子式も決定されず、「要するに難問」として保留されるにとどまった。日本では 1906 年、龜高德平が化学的研究に着手し⁴⁾、黒田チカが 1930 年日本化学會誌で報告している⁵⁾。のちに分子構造を提示したが、正しい分子構造は 1987 年の小野寺らの報告まで待つことになる^{6,7)}。Carthamin は 2 つのグルコースを有する C-C グリコシド構造であった。分子構造決定には質量分析、核磁気共鳴装置 (NMR) の進展が大いに寄与している。分子構造が決定すると、2018 年に全合成が^{8,9)}、2020 年には一部酵素反応を取り入れた生合成-有機合成ハイブリッド合成も報告された¹⁰⁾。これらの合成により carthamin の有機化学骨格構造は確定された。分析化学的にも天然物構造決定の定石法を基にして、誘導体化や様々な処理による純結晶形成の試みや、カラムクロマトグラフィーによる分離が試みられた。しかし、全合成が報告された現在でも ¹H, ¹³C-NMR の全帰属は報告され

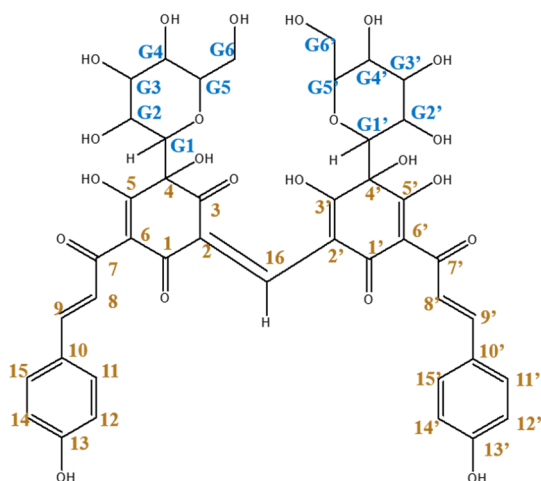


Fig. 1. carthamin の分子構造



Fig. 2. 内側に化粧紅が塗られた盃

¹ 東京工芸大学大学院工学研究科博士後期課程工業化学専攻 ² 東京工芸大学工学部生命環境化学科教授
2020 年 9 月 25 日 受理

ていない。100年以上前の「要するに難問」が解決されていないままである。

我々は「笹色」発色機構に着目して研究に着手した。高純度・高品質とされているが、何か非有機物が規則的に混入し、分子構造を形成していると仮定したのである。しかし、笹色は構造色ではなく、金属光沢であった^{11, 12, 13}。分析分野や合成分野において carthamin の笹色発色に関する学術的報告が皆無であることも我々の疑問であった。そこで我々は伝統的抽出精製法を化学的に精査し、伝統的紅原料紅餅（発酵処理ベニバナ花卉）、灰汁、酸成分の化学分析を行い、再現性よく carthamin 精製を達成した^{14, 15}。適切な処理で乾燥すると比較的安定で、可溶媒ジメチルスルホキシドやピリジン中では年単位で NMR や質量スペクトル変化のない事も確認している。詳細は別報で報告予定である。本稿ではカリウムを約 10% 含む carthamin の ¹H, ¹³C-NMR シグナルの全帰属について報告する。なお、カリウム含量はどのロットでもほぼ一定である。

実験

Carthamin の精製

100 g の乾燥紅餅（山形県産ベニバナ花卉発酵加工品紅花生産組合連合会）を蒸留水に浸し 48 時間冷暗所に静置し、繰り返し水洗して黄色色素と花粉を除いた。これを布製の袋に入れあらかじめ調製したアカザ灰汁（pH 12）に浸したのち、絞って赤色の染液を得た。乾燥ラミー繊維（アオソ）を染液に浸し、繊維を取り出して新しい pH 12 のアカザ灰汁を少しずつ繊維に滴下し、赤色を抽出した。烏梅液（主成分クエン酸、リンゴ酸混合液；pH 2.6）で pH 6.3 に調整すると、泥状の赤色沈殿物が生じる。これをガラスに塗布し、遮光下、室温で風乾、続いて 14 日間真空乾燥して緑色金属光沢を有する笹色紅 258 mg を得た^{14, 15}。薄層クロマトグラフィー（TLC）は 1 スポットで、R_f 値 0.42 であった。なお展開溶媒はブタノール、

酢酸、水 4:1:5 の上清液を用いた。質量分析は m/z 実測値 (Found.) 987.1343 で、C₄₃H₄₁O₂₂K₂ の理論値 (Calcd.) である 987.9698 と一致している。無機元素分析によるとカリウム (K) は 10.1 % w/w、ナトリウム (Na) は 0.038 % w/w であった。

測定

NMR は JEOL JNM-ECZ500R (日本電子(株)製) を用いた。標準的には 5 mg の笹色紅を直径 5 mm の NMR 試料管に入れ、0.75 ml の重ジメチルスルホキシド(DMSO-*d*₆: 関東化学(株)製) に溶解した。完全溶解は確認した。30 °C にて積算回数は ¹H で 64 回、¹³C で 40000 回である。質量分析はサーモフィッシャーサイエンティフィック社製 Q Exactive Plus を用い、NanoESI 法でイオン化した。K, Na の原子吸光分析は日立ハイテクノロジーズ製 Z-2300 型原子吸光分析装置を用いた。

結果と考察

¹H, ¹³C-NMR スペクトル

これまでの報告では重ピリジンと重メタノール混合溶媒で測定されていた^{6, 7, 9, 10}。ピリジンイソクラティック溶媒では OH 基シグナルが非常にブロードに観測される¹⁶。メタノールを添加すると H₂O も含め OH 基は同じシフト値で観測され OH 基の情報を得ることができない。

DMSO-*d*₆ イソクラティック溶媒中の ¹H, ¹³C-NMR スペクトルをそれぞれ Fig. 3a, 3b に示す。2.49 ppm に溶媒 DMSO 由来のメチル基、3.3 ppm に水由来 HDO が観測された。2.8 ppm 以下のシグナルは Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) で分離すると、他のシグナルと異なる拡散係数位置となることより、TLC では検出できなかったが *Carthamus tinctorius* L. 由来の微量不純物と判断した (Fig. 4)。DOSY 法で carthamin 由来と判断されたシグナルは高磁場側から 2.97, 3.09, 3.33, 3.46, 3.72, 3.81, 4.36, 4.64, 4.67, 4.77,

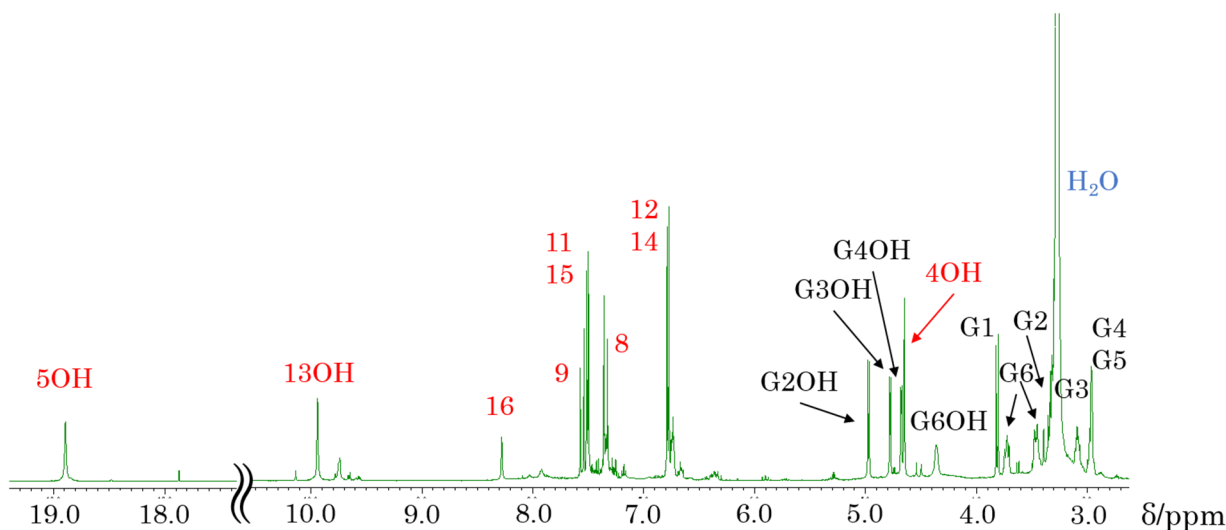
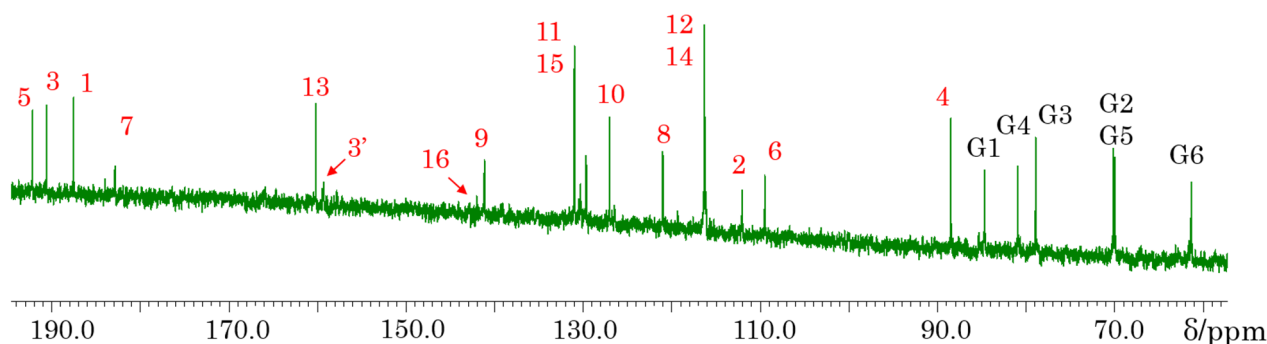
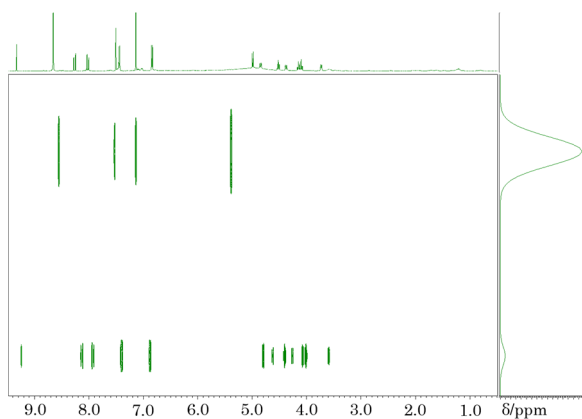
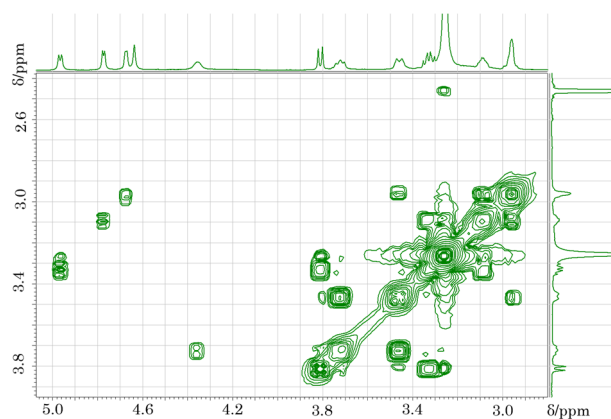
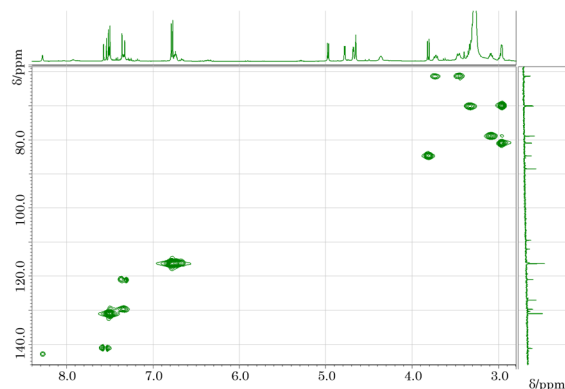


Fig. 3a. DMSO-*d*₆ 溶媒中の笹色紅 ¹H-NMR スペクトル

Fig. 3b. DMSO- d_6 溶媒中の笹色紅 ^{13}C -NMR スペクトル

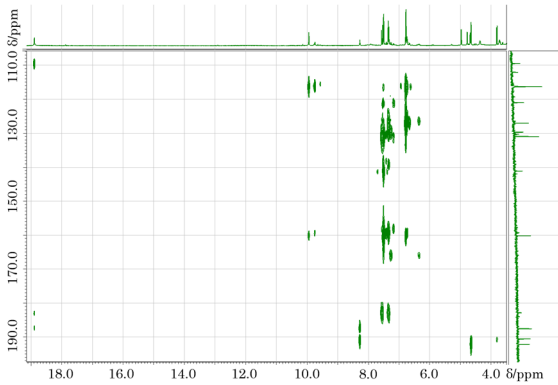
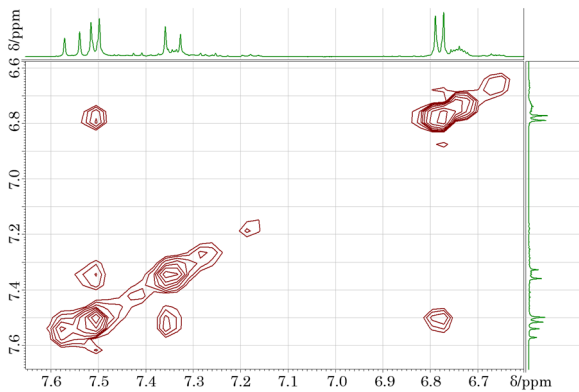
4.97, 6.87, 7.55, 7.51, 7.34, 8.28, 9.90, 18.89 ppm であった。重水を添加すると 4.36, 4.64, 4.67, 4.77, 4.97, 9.90, 18.89 ppm のシグナルが消失し、これらのシグナルは OH 由来と判明した。18.89 ppm のシグナルはベニバナ黄色色素 carthorquinoside A, B における, OH 基とカルボニル基の水素結合による著しい低磁場シフト現象報告と一致している^{17, 18)}。Carthorquinoside A, B では 5OH と 7C=O 間での互変異性が生じていたが, carthamin ではこの現象が起こっていないことが、数結合離れている異種核相関を検出する ^1H -detected Multiple-Bond heteronuclear multiple-quantum Coherence (HMBC) で確認された。シグナル上の番号は各プロトンに対応している。帰属の詳細は後述する。

同様に ^{13}C -NMR シグナルを示す (Fig. 3b)。23 シグナルで, carthamin を構成する全 43 炭素のうちグルコース由来炭素 6 種と 1, 2, 4-15 の 14 種の炭素は対称で, 同シフト値で観測された。3 と 3' はカルボニル基と水酸基の差異があり 2 シグナルに、16 位は 1 シグナルである。即ち $6+14+1+1+1=23$ となり炭素シグナルが過不足なく観測された。159.3 ppm の ^3C 由来シグナル以外は大森らの全合成 carthamin のシグナルと一致している^{9, 10)}。

Fig. 4. Pyridine- d_5 溶媒中の笹色紅 DOSY スペクトルFig. 5. DMSO- d_6 溶媒中の笹色紅 COSY スペクトルFig. 6. DMSO- d_6 溶媒中の笹色紅 HMBC スペクトル

各シグナルの完全帰属

過不足なく全シグナルが観測された。CORrelation Spectroscopy (COSY), H-detected heteronuclear Multiple-Quantum Coherence (HMBC) から帰属を開始した (Fig. 5, 6)。COSY は隣りあった C-C に結合している H を決定する手法であるが、O を介した場合も相関が得られる¹⁶⁾。これを適用して全ての水酸基のプロトンと結合している炭素を帰属した。また、HMBC から 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 13 を決定した (Fig. 7)。さらに 8, 9 については空間的に近距離 (0.4

Fig. 7. DMSO-*d*₆ 溶媒中の笹色紅 HMBC スペクトルFig. 8. DMSO-*d*₆ 溶媒中の笹色紅 NOESY スペクトル

nm 以内)にある H を検出する Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (NOESY)の結果を総合し、最も矛盾のない帰属とした (Fig. 8). 3'-OH の H のみが観測されなかった。K 塩となっている可能性を指示している。カウンターイオンを Na などに変えて精製した生成物の質量分析や NMR などを用いた。詳細な検討は今後の課題である。

結論

伝統的手法を精査し、無機分析も併用し、報告されていた carthamin 分子の ¹H, ¹³C-NMR シグナルの完全帰属を達成した。固体分析も含めた分子構造解析は現在進行中である。しかし、本情報が不安定で「要するに分析困難」の壁を破ったことは事実であり、ベニバナ研究および品質管理の一助となることを確信する。

謝辞

本研究は科研費 20K01108 の助成を受けたものです。また 2020 年度東京工芸大学の国際科学芸術センターテーマに採択され助成を受けたものです。

参考文献

1) 吉岡幸雄「日本の色辞典」紫紅社 (2000).

- 2) 第 17 改正日本薬局方 (2016).
- 3) A. Schlieper, *Ann.*, **58**, 369 (1846).
- 4) 龜高德平, 紅の研究 (豫報) 東京化学會誌 **27(11)**, 1202-1217 (1906).
- 5) 黒田チカ, 紅花の色素カーサミン(第一報) 日本化学會誌 **51**, 237-255 (1930).
- 6) H. Obara, J. Onodera, The structure of carthamin, *Chem. Lett.*, **8(2)**, 201-204 (1979).
- 7) Y. Takahashi, N. Miyasaka, S. Tasaka, I. Miura, S. Urano, M. Ikura, K. Hikichi, Constitution of two coloring matters in the flower petals of *Carthamus tinctorius* L., *Tetrahedron Lett.*, **23**, 5163-5166 (1982).
- 8) T. Hayashi, K. Ohmori, K. Suzuki, *Org. Lett.*, **19**, 866-869 (2017).
- 9) K. Azami, T. Hayashi, T. Kusumi, K. Ohmori, K. Suzuki, Total synthesis of carthamin, a traditional natural red pigment, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 5321-5326 (2019).
- 10) Y. Abe, T. Sohtome, S. Sato, Biomimetic synthesis of carthamin, a red pigment in safflower petals, *via* oxidative decarboxylation, *J. Heterocyclic Chem.*, 1-6 (2020).
- 11) 矢島仁, 佐々木麻衣子, 高橋圭子, 平岡一幸, 大嶋正人, 山田勝実, 伝統的手法で抽出されたベニバナ色素膜の緑色金属光沢について—光学的手法による検討—, 日本写真学会誌, **81(1)**, 65-69, (2018).
- 12) H. Yajima, M. Sasaki, K. Takahashi, M. Oshima, K. Hiraoka, M. Yashiro, K. Yamada, Influence of photo-illumination on greenish metallic luster of safflower red pigment film, *Bull. Soc. Photogr. Imag. Japan*, **28(2)**, 18-22 (2018).
- 13) 柿 拓馬, 森井 達也, 佐々木 麻衣子, 大嶋 正人, 高橋 圭子, 平岡 一幸, 八代 盛夫, 矢島 仁, 山田 勝実, 金属元素を含まない材料から生じる金属光沢の光学特性, 東京工芸大学工学部紀要, **43(1)**, 6-9 (2020).
- 14) 佐々木麻衣子, 大嶋正人, 高橋圭子, 平岡一幸, 山田勝実, 矢島 仁, ベニバナ生花を原料とする口紅「笹色紅」の伝統的な製法とその改良, 東京工芸大学工学部紀要, **41(1)**, 86-89, (2018).
- 15) 佐藤泰輔, 佐々木麻衣子, 矢島仁, 大嶋正人, 山田勝実, 高橋圭子, 伝統的手法を基盤とした精製紅花色素カルサミンの立体構造と笹色発色機構, 第 61 回天然物有機化学討論会(P1-22), 2019/9/11 広島
- 16) K. Takahashi, K. Hamamura, Y. Sei, *J. Incl. Phenom. Macrocyc. Chem.*, **93**, 97-106 (2019).
- 17) Z. Feng, J. He, J. Jiang, Z. Chen, Y. Yang, P. Zhang, NMR solution structure study of the representative component hydroxysafflor yellow A and other quinochalcone C-glycosides from *Carthamus tinctorius* L., *J. Nat. Prod.*, **76**, 270-274 (2013).
- 18) S. Yue, C. Qu, P. Zhang, Y. Tang, Y. Jin, J. Jiang, Y. Yang, P. Zhang, J. Duan, Carthorquinosides A and B, quinochalcone C-glycosides with diverse dimeric skeletons from *Carthamus tinctorius* L., *J. Nat. Prod.*, **79**, 2644-2651 (2016).