

水溶液中におけるケルセチンとCu²⁺の相互作用

Interaction between quercetin and Cu²⁺ in aqueous solution

鈴木 恒夫 Tsuneo Suzuki

小林 優子 Yuko Kobayashi

Abstract: We had examined about the onionskin dyeing for the purpose of utilizing wasted onionskin. In the last report¹⁾, silk and cotton cloths were dyed by the dyestuff extracted from onionskin. The hues of dyed cloths were quite different according to the kinds of the mordant metals.

In the plant dyeing, the mordant metal has an important role in color development and fixing. It is reported²⁾ that the dyed cloth has the antibacterial function by the mordanting process. It is expected that plant dye can exhibit a new function in addition to coloring.

In this experiments, the interaction between quercetin and Cu²⁺ in aqueous solution was examined. The complex formation of quercetin and Cu²⁺ was suggested from the absorption spectra of these mixed solutions. The density ratio of the complex formation was expected as [quercetin:Cu²⁺]=[2:1] or [3:1]. Absorbance of the solution just after mixed was the same value with that of an hour later. So the structure of the complex is stable. The combination of quercetin and Cu²⁺ was influenced by the initial pH of mixed solutions greatly.

The absorption wavelength pertain to the complex formation was 506nm at pH9 above and 418nm at pH9 lower.

Key words: quercetin, Cu²⁺, complex formation, absorption spectra

1. 緒言

タマネギ外皮の有効利用を目的に、外皮に含まれるケルセチン色素に注目し、さまざまな視点から実験を試みてきた。前報¹⁾では、セルロース繊維およびたんぱく質繊維をタマネギ外皮から抽出した色素を用いて染色実験を行い、媒染金属の違いにより数種類の色相に染め分けることができることを報告した。

タマネギ外皮をはじめ植物染料における染色過程で、媒染金属は、染着、発色などの過程で重要な役割を果たしている。また、媒染処理により染色布が抗菌性²⁾を持つこと、タマネギ外皮中のケルセチン色素が紫外線防止機能を有すること³⁾など新たな機能性の付与に関する報告がなされている。本報告においても媒染金属を選択することにより、発色以外の機能を付加できることが期待できる。しかし、安全かつイメージも良好な植物色素の有効利用を促進するにあたって、それら植物色素は不安定であること、また種類も多いことなどから、金属と色素

の相互作用に関する基礎データを積み重ねる必要がある。そこで本実験では、媒染金属としてCu²⁺に焦点をあて、ケルセチン色素との相互作用について調べた。ケルセチンは、植物染料の中の数多い黄色系色素の1つであり、金属との結合状態を探ることは、他のフラボノール類を含む植物染料の機能性を探る上でも有効と思われる。

繊維上では、繊維、色素、金属の3種の相互作用が関わってくるため、本実験ではまず、水溶液中での結合状態を検討することとした。また、ケルセチンとのキレート形成について、すでに報告⁴⁾されているAl³⁺キレートの吸収スペクトルとの比較をした。

2. 実験

2-1) 試薬

タマネギ外皮中の色素の主な成分であるケルセチン C₁₅H₁₀O₇を、メチルアルコールにて溶解した

0.01mol/l 溶液を原液として実験に供した。媒染金属として酢酸銅 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 硫酸アルミニウムカリウム $\text{AlK}(\text{O}_4)_2 \cdot 12\text{xH}_2\text{O}$, および pH 調整のために水酸化ナトリウム NaOH を用いた。試薬はすべて特級試薬を用い, 異なる金属の影響をさけるためイオン交換蒸留水で希釈して用いた。ケルセチン水溶液は, 原液をイオン交換蒸留水にて希釈して調製したが, この時希釈率を 50 倍以上とし, メタノールの影響がでないようにした。

2-2) ケルセチン水溶液と Cu^{2+} 水溶液

ケルセチン原液から希釈したケルセチン水溶液と Cu^{2+} 水溶液を混合した。混合率はモル濃度比で示した。

また, それら混合液の pH を変化させ紫外可視吸収スペクトルを測定し, ケルセチンと Cu^{2+} の結合状態について検討した。

2-3) 測定

溶液の紫外可視吸収スペクトルは, 日立分光光度計 228A を用い測定した。pH 測定には東亜 HM-50V を使用した。

3. 結果・考察

3-1) ケルセチン水溶液

ケルセチン水溶液は調製時から 3 時間経過すると, ケルセチン特有⁵⁾ の 366nm のピークの低下, および, 吸収スペクトルが全体に低下, その水溶液は調製直後早い時間から, 透明から次第に白濁してくる。ケルセチンは通常, 植物中において配糖体として存在しており, 単離されたケルセチン単体の状態では水溶液中で徐々に変化していると考えられる。そこで, ケルセチン変化の影響がないように, ケルセチン水溶液調製直後に混合液を調製し, 測定をおこなった。

また予備実験でケルセチン水溶液に Cu^{2+} を加えることで, 吸収スペクトルの低下が押さえられることを確認した。このことは, Cu^{2+} とケルセチンとの相互作用により, 色素が安定化するものと考えられ, モル比がケルセチン : Cu^{2+} = [2 : 1], [1 : 1] において, 418nm 付近に現われる新しいショルダーが Cu^{2+} との錯体形成に参与する吸収であると予測された。

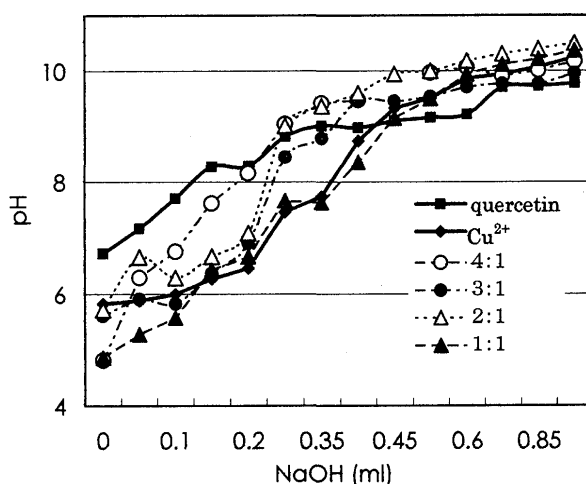


Fig.1 pH titration curves of the mixed solutions. quercetin : Cu^{2+} = [4 : 1], [3 : 1], [2 : 1], [1 : 1]

3-2) pH 滴定曲線

3-1) で錯体形成が考えられたことから, ケルセチンと Cu^{2+} 濃度比率を変化させ, 0.01M 水酸化ナトリウムにて滴定した。Fig.1 にその滴定曲線を示す。濃度比は, ケルセチン : Cu^{2+} = [1 : 1], [2 : 1], [3 : 1], [4 : 1] である。ケルセチン水溶液の滴定曲線は, pH8~10 の間で緩衝域がみられた。pH9 以下において, ケルセチンよりも混合液の pH が低いことは, Cu^{2+} 混合による影響であり, この領域でケルセチンからプロトンの放出が起き錯体の形成が行なわれると考えられる。混合比が [1 : 1] > [3 : 1] > [2 : 1] > [4 : 1] の順に pH の低かった。しかし, 明確な変曲点および緩衝域がみられないことは, ケルセチンの解離した陰イオンとケルセ

チン自身の加水分解, さらに Cu²⁺との錯体形成が混在していることが推測される. 比較的緩衝域がはっきりしているものは, 混合比[2 : 1], [3 : 1]であった.

3-3) 混合液の初期 pH の影響

混合液の pH は 3-2) の結果を踏まえ, 初期 pH 値として, 無調整, pH 6, pH 8.8, そしてケルセチンの解離がみられる pH 10 の 4 条件にて実験をおこなった. 予備実験では, ケルセチン水溶液の pH を変化させると, およそ pH 9 までは 366nm のピークが徐々に長波長側にシフトし (26nm), pH 9 以上でその吸収が低下, そして新たに 318nm 付近にピークが現われてくる. そして, 高アルカリ下では, そのピークも低下した. pH 無調整の混合液では, 366nm のシフトと考えられるショルダーが 418nm 付近に現われ, またアルカリ条件下で 506nm の新しい吸収を確認した. そこでケルセチンと Cu²⁺の結合による吸収と考えられる 418nm, 新しく現われた 506nm での吸光度も同時に比較した.

3-3-1) pH 無調整時の吸収スペクトル

Fig. 2 に, pH を変化させずに, ケルセチンと Cu²⁺を混合させたときの 418nm と 506nm の吸光度変化を示した. グラフは, Cu²⁺ 1 モルに対するケルセチンのモル数と吸光度の関係を表している. ケルセチン水溶液に Cu²⁺の濃度を変えて添加した場合, Cu²⁺ 過剰の条件では吸光度が高く, 逆にケルセチンの割合が多くなると低下していく. 506nm では, わずかであるが吸収の増大がみられた.

3-3-2) pH 6 における吸収スペクトル

Fig. 3 に初期 pH 6 の混合液におけるケルセチンのモル数と吸光度の関係を示した. 調整直後では, 506nm の吸収は無調整の場合と同様の結果を得

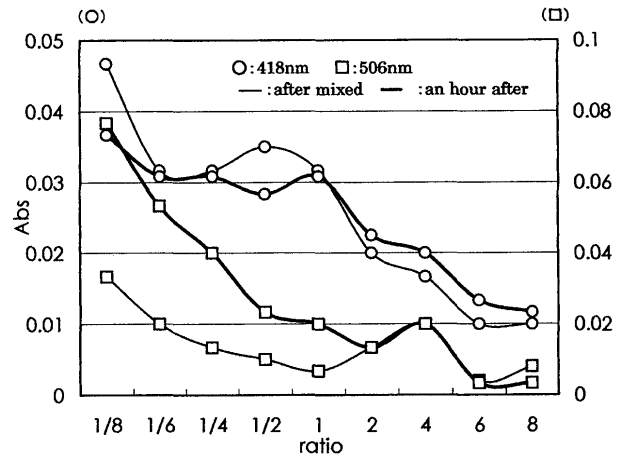


Fig.2 Relationship between absorbance of the mixed solutions and the mixing ratio of Cu²⁺ and quercetin. pH of the solutions were uncontrolled at 418 and 506nm. The abscissa axis is a ratio of quercetin for Cu²⁺

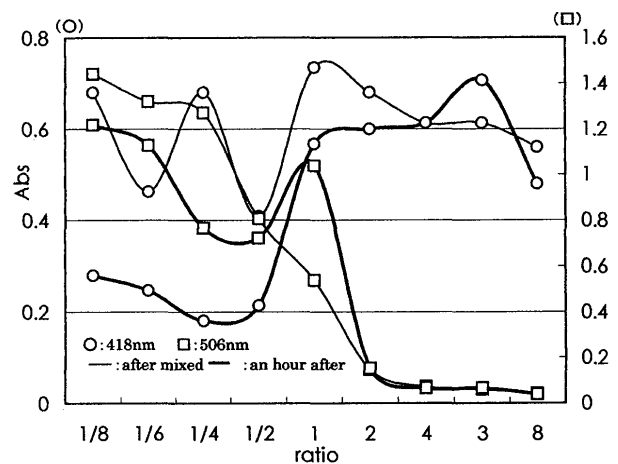


Fig.3 Relationship between absorbance of the mixed solutions and the mixing ratio of Cu²⁺ and quercetin. The solutions were adjusted to pH6 at 418 and 506nm. The abscissa axis is a ratio of quercetin for Cu²⁺

た. しかし, 418nm の吸収は Cu²⁺過剰状態では, 吸光度の変化が大きく, ケルセチン量が多くなると吸光度はほぼ一定の値を示した.

3-3-3) pH 8.8 における吸収スペクトル

混合液の初期 pH を 8.8 に調整した場合の吸光度変化を Fig. 4 に示した。418nm の吸光度は、ケルセチン量 2 倍以上で高い値を示し、506nm の吸収はケルセチンが増えるにつれ低下した。このときの 418nm における高い吸収は Cu²⁺ との結合による影響でなく、ケルセチン水溶液のみで 0.09 という高い値を示すことからこのような結果となったものと思われる。また、506nm の吸収については、ケルセチン、Cu²⁺ のどちらの水溶液も吸収を持たない波長であるため、特にアルカリ側でのケルセチンと Cu²⁺ の混合液の結合状態を検討するに適した波長と考えられた。

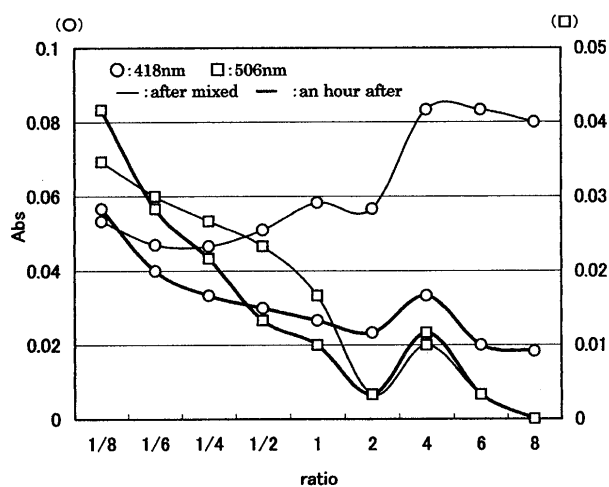


Fig.4 Relationship between absorbance of the mixed solutions and the mixing ratio of Cu²⁺ and quercetin. The solutions were adjusted to pH8.8 at 418 and 506nm. The abscissa axis is a ratio of quercetin for Cu²⁺

3-3-4) pH 10 における吸収スペクトル

Fig. 5 は、初期 pH10 における混合液の吸光度である。Cu²⁺ 過剰では、混合液の吸収がわずかなため、[1 : 1] 以上の混合率を示した。ケルセチンは、高アルカリで加水分解をおこし⁵⁾ 418nm 付近の吸収は低下してくる。506nm では吸収を持たない。し

かし作成直後、418nm においてはケルセチン量が多いほど、506nm では 1~2 倍のケルセチン量での吸光度が高くなった。これは一時的に溶液をアルカリにしたため、418nm の吸収はケルセチン自体の変化によるもので、通常の 366nm ピークが長波長側にシフトした吸収が混在しているものと思われる。また 506nm はケルセチン量 1~2 倍において Cu²⁺ との結合が推測され、それ以上ケルセチンが多いと、Cu²⁺ との結合が存在してもケルセチンの変化が大きく吸光度に影響するものと考えられる。

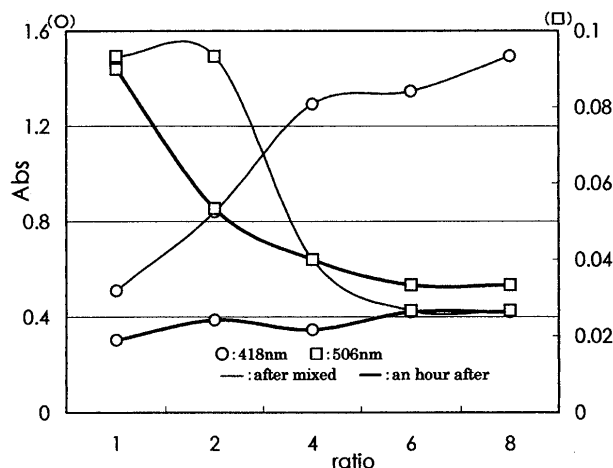


Fig.5 Relationship between absorbance of the mixed solutions and the mixing ratio of Cu²⁺ and quercetin. The solutions were adjusted to pH10 at 418 and 506nm. The abscissa axis is a ratio of quercetin for Cu²⁺

3-4) 混合液の経時変化

混合液の pH の経時変化を Fig.6 に表した。初期 pH は無調整である。各混合率におけるケルセチン-Cu²⁺ 混合液の 1 時間後の吸光度 (Fig. 2~5) と合わせて考察した。Cu²⁺ の pH 変化を見ると、作成後 1 時間までは、酢酸銅の解離により pH が上昇するが、それ以後、水酸化物の生成により pH は低下する。ケルセチンは OH⁻ の脱離が続くため時間とともに pH は上昇すると考えられ、作成後 2 時間後の

pH 変化が大きい。ケルセチンが1以上の混合液は、1時間でpH値は上昇し、以後変動は少ない。ゆえに、調製後1時間の間に錯体の形成が起こり易いと考えられる。特にpH無調整の混合液の吸光度 (Fig. 2) は、506nmにおいて、Cu²⁺過剰の場合は1時間後の吸光度は上昇し、ケルセチン過剰の場合は調製直後の吸光度とほぼ同じ値をとった。Cu²⁺に対して濃度比2以上では、混合すると同時に結合しそれが1時間経過しても壊れることなく維持されていると考えられた。また、Cu²⁺過剰での吸光度の増加については、酢酸銅自体の変化が大きいと考えられ今後さらに検討を加えたいと思う。418nmの吸収は、やはりケルセチンがCu²⁺の2倍以上で吸光度が上昇していることから、これら混合率で錯体の形成が予想される。

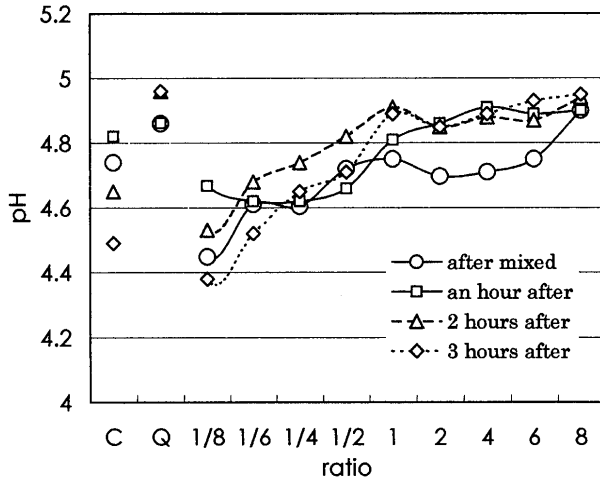


Fig.6 The time-course change of pHs of the mixed solutions.

pHs of the solutions were uncontrolled.

C : Cu²⁺ Q : quercetin

初期pH 6の場合 (Fig. 3), 1時間後の吸光度は、418nm および 506nm とともに Cu²⁺に対してケルセチンが1以上で初期の吸光度値をほぼ保つかあるいは増加する傾向を示した。無調整の場合と同様、混合直後の結合が1時間経過後も維持されていることが

考えられる。また、418nmにおけるCu²⁺過剰では急激な吸光度低下がみられた。

さらに混合液の初期pHをアルカリ状態にした場合 (Fig. 4, 5), 1時間後の418nmの吸光度は混合率に関係なく低下した。混合直後の高い吸収は、この低下の様子から一時的なものであると裏付けられる。またpH 8.8における506nmの吸収はケルセチン量が2倍以上で作成後と同様の吸光度を示し、錯体が安定していることが示唆された。pH10における吸光度の変化は、ケルセチンが不安定な色素であることから、錯体形成以外の影響が大きいものと思われる。

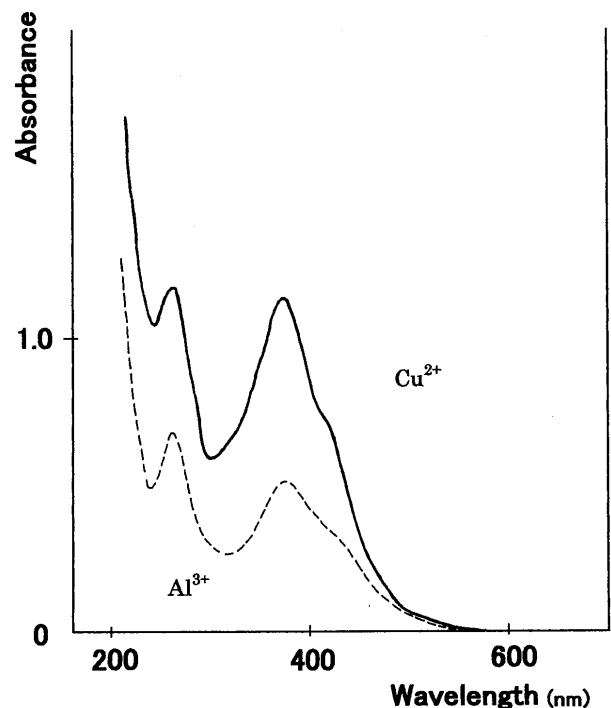


Fig.7 Comparison of absorption spectra of between Cu²⁺-quercetin and Al³⁺-quercetin.

Cu²⁺ : quercetin = [2:1]

16 × 10⁻⁵ mol/l : 8 × 10⁻⁵ mol/l

Al³⁺ : quercetin = [2:1]

8 × 10⁻⁵ mol/l : 4 × 10⁻⁵ mol/l

3-5) Al³⁺とCu²⁺の吸収スペクトルの比較

前報¹⁾で、得られた染色布がAl媒染とCu媒染に近い色相を示したことから、両者の吸収スペクトルと特性吸収波長を比較した (Fig.7). 濃度比はケルセチン：金属 (Al³⁺, Cu²⁺) = [2 : 1]とし、混合液調製直後に測定した。また混合液のpHのコントロールはしなかった。金属種が異なってもピーク波長はAl, Cuともに270nmおよび370nm付近に現われ、そして420nm付近にショルダーがみられた。Al³⁺はすでにケルセチンと錯体を形成することが報告⁴⁾されており、この420nm付近のショルダーが錯体形成を示す吸収であると考えられる。Cu²⁺のpH無調整の場合は、420nmのショルダーもAl³⁺ほど明確ではないため、これだけで錯体が形成されたと判断することはできない。しかし吸収スペクトルがAl³⁺と同じ形状であること、また染色布の色相が似ていることなどを考慮すると、pH無調整で、金属とケルセチンの濃度比率が同じ場合、Cu²⁺とAl³⁺ケルセチン色素と同じような結合状態をとるのではないかと推測された。

4. 結論

ケルセチン水溶液とCu²⁺の混合液の吸収スペクトルより、ケルセチン-Cu²⁺の錯体が形成されると考えられた。形成の濃度比率は、ケルセチン：Cu²⁺ = [2 : 1], [3 : 1]と予想された。そして混合液のpHに大きく左右され、初期pH値で形成される錯体の数が異なると考えられる。また1時間経過後の吸光度が混合初期と同じ値を維持し、増加がみられないことは、[2 : 1], [3 : 1]では1時間まで初期pH値の影響でケルセチン-Cu²⁺の形成が決定されることが示唆された。

錯体形成に関与すると考えられる吸収波長は、pH9以下では418nm、それ以上では506nmと考えられる。

また418nmは、ケルセチンの持つ波長366nm

の錯体形成による長波長側へのシフトと考えられ、506nmはCu²⁺との特徴的な吸収ではないかと考えられる。

Al³⁺添加による吸光スペクトルとCu²⁺添加における吸収スペクトルの形状が、pH無調整の場合において類似する結果となった。これは遷移原子であるCu²⁺が典型原子のAl³⁺と同じように、外軌道のイオンが結合に関係しているためであり、前報でも報告したように、Al媒染、Cu媒染の染色布の色相が似ていることが裏付けられた。このときの結合は418nmの吸収に関与する結合と考えられ、今回アルカリ条件であらわれた506nmの結合でないことが推測され、アルカリ条件での検討をさらに加える必要があると思われる。

日本家政学会第58回大会 (秋田) および The 20th IFHE World Congress (東京) において一部を発表した。

参考文献

- 1) 鈴木恒夫, 小林優子: たまねぎ外皮で染色した染色布の色相, 長野県短期大学紀要, 57, 63-69 (2002)
- 2) 三村温子, 中島健一: 長野県情報技術試験場研究報告 (2003)
- 3) 津志田藤二郎, 新本洋二, 小堀真珠子, 篠原和毅: 紫外線防止機能を有する植物成分の解明と利用, 食品研究成果情報, 6 (1994)
- 4) 矢田部佳見: タマネギの色素ケルセチンによるアルミニウムの吸光光度定量, 化学と教育, 38, 568-571 (1990)
- 5) 林孝三: 増訂 植物色素, 養賢堂, (1991)