

に、KBr 法では、試料を含まない KBr 錠剤、スジョール法では、KBr セル板 1 枚を、原則として使用した。測定時の分解能としては  $4\text{ cm}^{-1}$  (32 回繰り返す) を主に用いた。なお、使用した分光器 (FT-IR 装置) は、簡易型の Nicoret (株) 製フーリエ変換形赤外分光光度計で、公称  $400\text{ cm}^{-1}$  まで測定可能であるが、実用的な波数限界は約  $450\text{ cm}^{-1}$  である。

### C. 研究結果

現時点で、データベースから得られるベタインの IR スペクトルは、次の 3 種である。① The Sigma Library of FT-IR Spectra (Fig. 2) ②独立行政法人産業技術総合研究所・有機化合物のスペクトルデータベース SDBS (Fig. 3) および ③ National Institute of Standards and Technology, USA (NIST) の WebBook (Fig. 4) である。このうち、①と③は、ペースト法、②は KBr 法によるものと考えられる。これらの IR スペクトルは、互いに異なり、同じ物質とは思えない。さらに、メーカー測定用の KBr 法の IR スペクトルは、これらのいずれとも異なっていた (未掲載)。そこで、国際標準となる得る IR スペクトルを選定するため、アルカリハライド (KBr) や水分などが IR スペクトルに及ぼす影響を検討し、測定条件などを定めることにした。

#### 1. アルカリハライドの影響

検討に先だって、乾燥したベタイン ( $105^\circ\text{C}$ , 3 時間) について、公定書記載の

方法に従って KBr 法で測定を試みた。得られた IR スペクトルを Fig. 5 に示す。この IR スペクトルは、産業技術総合研究所・有機化合物のスペクトルデータベースのベタインの IR スペクトルと一致し、問題がないように見える。しかし、ここには示していないが、メーカーが測定した IR スペクトルと、一致しなかった。また、ベタインは、Fig. 1 にも示すように、分子内に電荷を持つので、KBr との相互作用も考えられる。そこで、KBr との相互作用の有無を検討するため、KCl を用いても錠剤を作成し、その IR スペクトルを測定した、その結果を Fig. 6 に示す。

Fig. 5 と Fig. 6 とを比較すると、両者が異なっていることがわかる。このことは、ベタインは、アルカリハライドと混和・すり混ぜ、あるいは加圧などによってアルカリハライドと相互作用し、本来の IR スペクトルと異なるスペクトル (異常スペクトル) を与えることを示している。そこで、この異常スペクトルを与える原因を解明するため、アルカリハライドとベタインを混和したものについて、ペースト法で測定した。その結果を、Fig. 7 と Fig. 8 に示す。なお、この際、試料ベタインとアルカリハライドの比率は、約 1:10 になるようにし、めのう乳鉢で擦り混ぜ、その一部を測定試料とした。測定には、通常のペースト法より試料の厚みを厚くし、対照には通常通り KBr 板 1 枚を使用した。

KBr 共存下に IR スペクトル (Fig. 7) を単純な KBr 法の IR スペクトル (Fig. 5) と

比較すると、高波数域は、極めて類似し、ほぼ一致していると判断できる。さらに、 $1000\sim 800\text{ cm}^{-1}$ の領域も、余分な吸収帯が観測されるが、ほぼ一致している。これらのことは、ベタインは、KBr とすり混ぜるだけで、KBr と相互作用をするものと考えられる。このことは、ベタインそのものとして、IR スペクトルを測定していないことを意味する。一方、メーカーで得られる KBr 法の IR スペクトルが、Fig. 5 と一致しないことを考慮すると、空気中の水分も影響している可能性がある。このことは、上記余分な吸収帯が、次に述べる水和物の吸収帯と一致することからも支持される。

一方、KCl 共存下の IR スペクトル (Fig. 6) を KCl 錠剤法の IR スペクトル (Fig. 8) と比較すると、高波数域を除き、ほぼ一致する。したがって、ベタインは、KCl とは KBr 程顕著な相互作用をしないものと判断した。しかし、これらの IR スペクトルは、次に述べる水和物の IR スペクトルとほぼ一致する。このことは、KCl 法といえども測定環境、とくに測定室の湿度が IR スペクトルに影響を与えることを示唆している。

さらに、Fig. 9 に示すように、KBr 錠剤を作成する際に、すり合わせを十分に行わなかった場合、Fig. 6 とは異なる IR スペクトルが得られた。このことは、KBr とベタインをすり合わせ時に、空気中の水分を吸収することを示している。したがって、KBr 法では、必ずしも再現性のある IR スペクトルが得られるとは限らない。とくに、著者の所在地 (西日本) や産業技術総合研究所

の所在地 (関東) と、ベタインの主な産地である寒冷地 (北海道や北欧など) とは、あまりにも湿度が異なりすぎる。そのため、KBr 法では IR スペクトルに差が出やすいと判断できる。

そこで、ペースト法を用いて、IR スペクトルを検討することにした。

## 2. ペースト法における水分の影響

まず、製品について、ペースト法で測定した。得られた IR スペクトルを Fig. 10 と Fig. 11 に示す。両者を比較すると殆ど差はない。

一方、製品の IR スペクトルを上記 KBr 法の IR スペクトル (Fig. 5) と比較すると、同じ試料と思えないほど、異なっている。しかも、National Institute of Standards and Technology による IR スペクトル (Fig. 4) と類似しているが、高波数領域が著しく異なっている。これらのことは、Fig. 4 が標準 IR スペクトルとはなり得ないことを示している。そこで、筆者は、ベタインが吸湿性であることを加味して、試料中の水分が IR スペクトルに影響を与えているのではないかと考え、検討することにした。

まず、IR スペクトルのデータベースを検討したところ、ベタイン-水和物の IR スペクトルが、The Sigma Library of FT-IR Spectra に収載されている (Fig. 12)。この IR スペクトルを上記製品の IR スペクトルと比較すると、極めて類似していた。したがって、製品は、無水ベタインとの表示があっても、基本的に、一水和物を含んでい

るものと考えられる。しかも、製品によっては含水率が異なると考えられる。そのため、製品そのままの IR スペクトルでは、標準 IR スペクトルとはなり得ない。

そこで、無水物を得るために、乾燥条件を検討した。まず、常温で、減圧下、5 酸化リン上で、5 時間乾燥したが、IR スペクトルには、殆ど変化が観測されなかった。次いで、乾燥減量試験の乾燥条件で、乾燥し、IR スペクトルを測定した。その結果を、Fig. 13 と Fig. 14 に示す。日本甜菜製とダニスコ製の IR スペクトルは、Fig. 13 と Fig. 14 から分かるように、一致し、しかも The Sigma Library of FT-IR Spectra の IR スペクトル (Fig. 2) と一致した。したがって、ここで得られた IR スペクトルは、標準 IR スペクトルとなり得ると判断した。

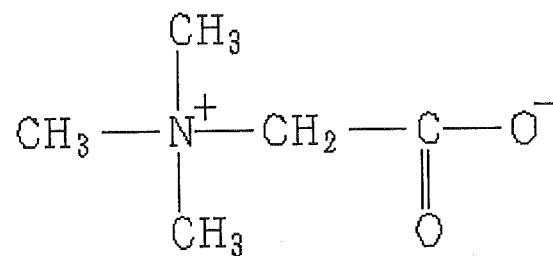
## E. 結 論

国際的に通用するベタインの標準 IR スペクトルの測定法と、標準となる得る IR ス

ペクトルを得るために検討を加えた。その結果、市販ベタインを乾燥減量測定法の条件で、市販ベタインを乾燥し、それを流動パラフィンを用いるペースト法で測定すれば、測定場所を問わず、再現性のある IR スペクトルが得られることを明らかにした。このようにして、得られたベタインの IR スペクトル (Figs. 13 と 14) は、ベタインの国際標準としての IR スペクトルになり得ると結論した。これは、添加物の確認試験に有益な結論であるため、食の安全性に寄与すると考えられる。

SDBS-NO= 4733

BETAINE



**Compound Name:** betaine, trimethylammonioacetate, glycinebetaine

(carboxymethyl)trimethylammonium hydroxide inner salt

用途：水分活性低下剤，発酵促進剤，化粧品—保湿剤—など

Fig. 1 ベタインの構造，別名と用途

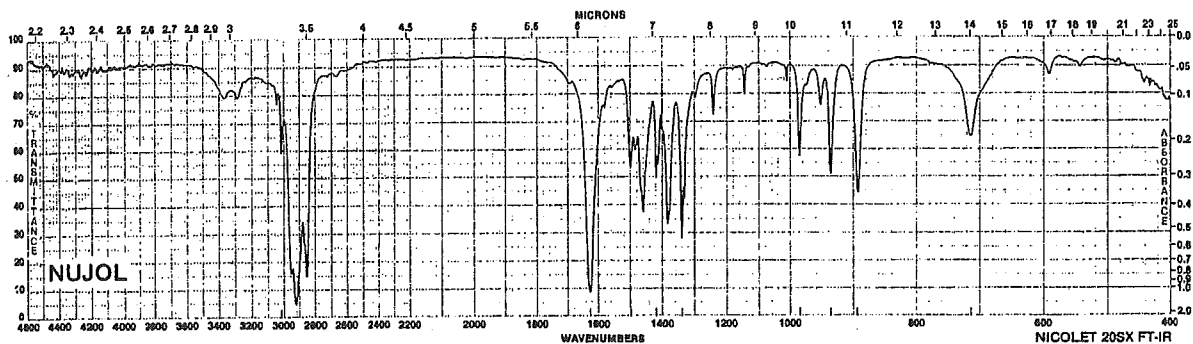


Fig. 2 無水ベタイン IR スペクトル (ペースト法)  
 (The Sigma Library of FT-IR Spectra より)

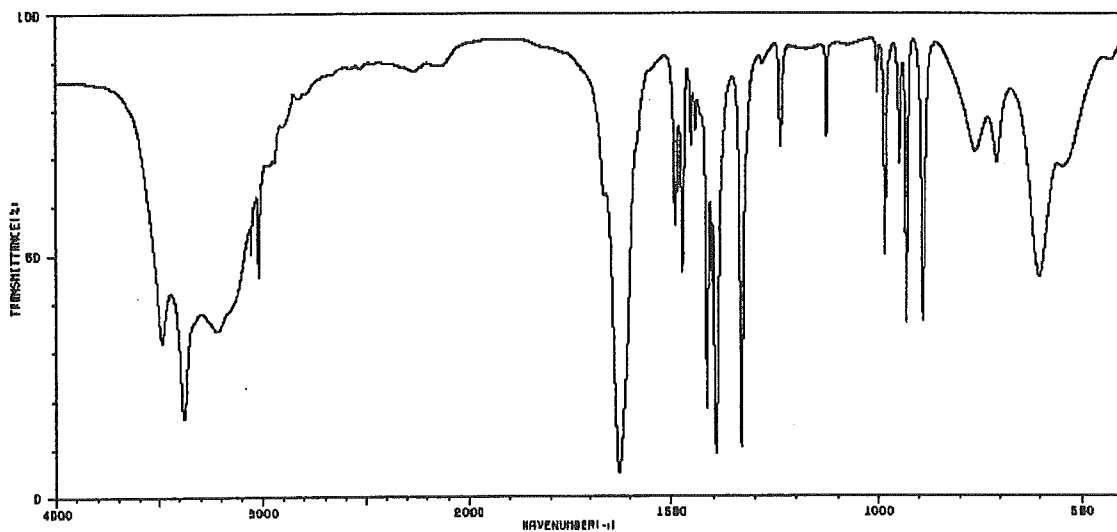


Fig. 3 無水ベタイン IR スペクトル (KBr 法)  
 (産業技術総合研究所・有機化合物のスペクトルデータベースより)

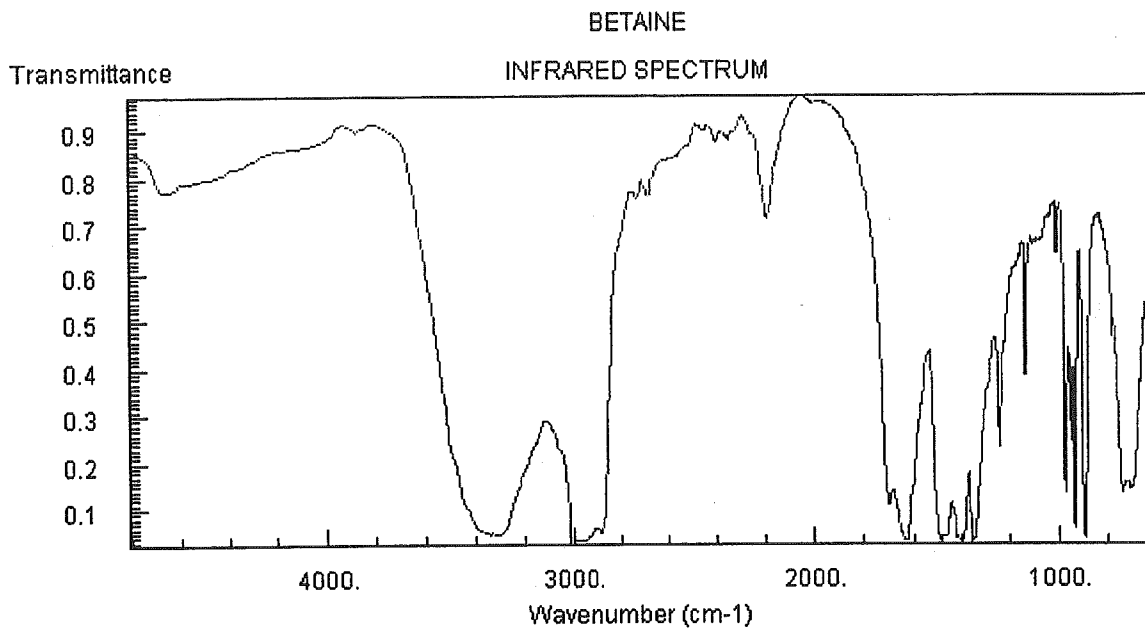


Fig. 4 無水ベタイン IR スペクトル (ペースト法)  
(National Institute of Standards and Technology, USA より)

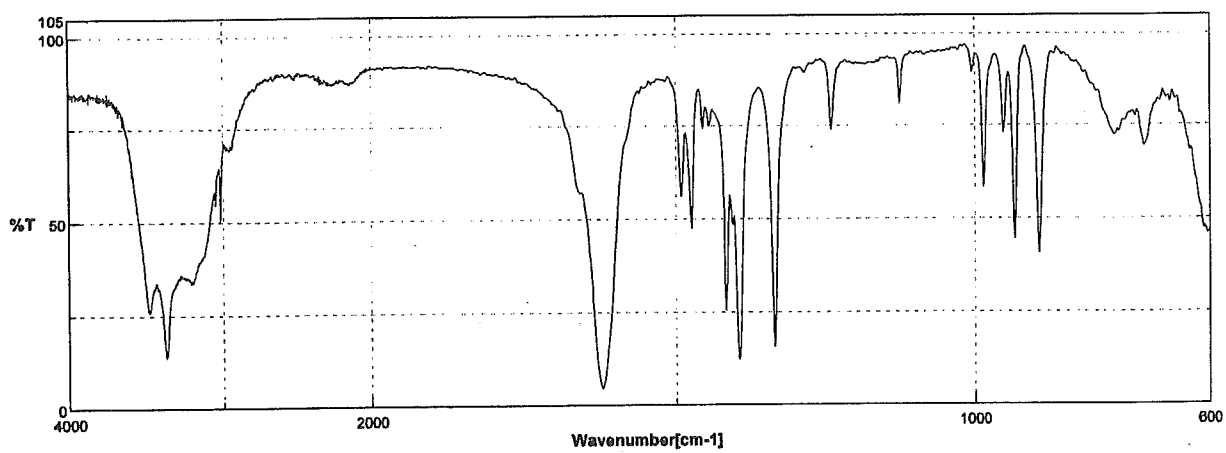


Fig. 5 乾燥ベタインの IR スペクトル (KBr 法)

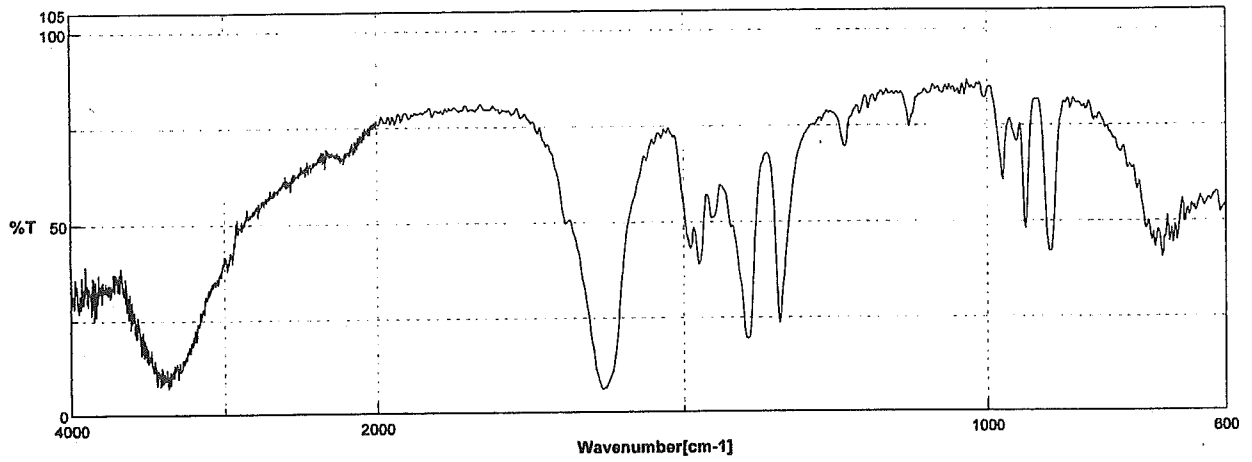
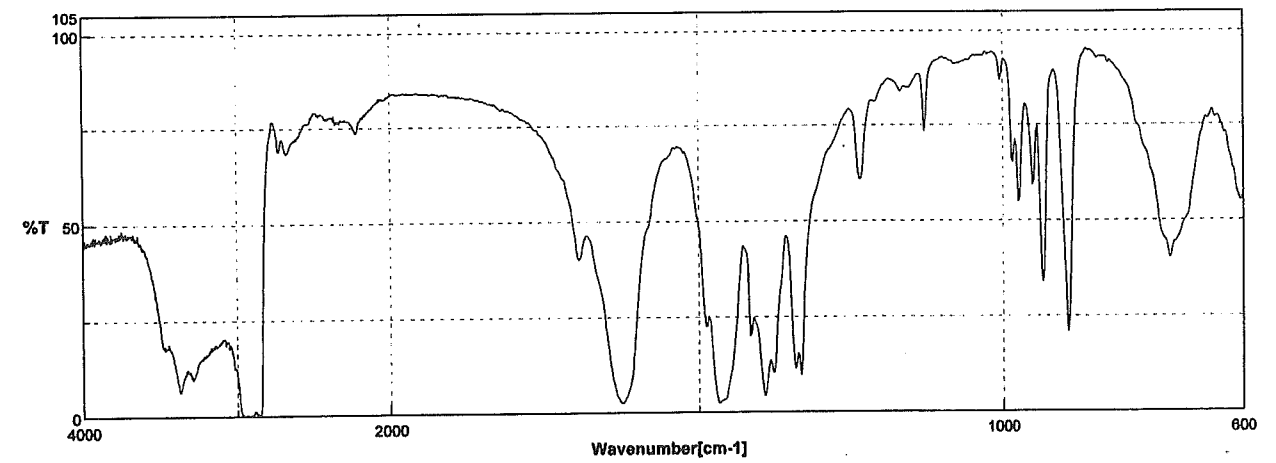


Fig. 6 乾燥ベタインの IR スペクトル (KCl 法)



日時

2006/03/21 15:08

Fig. 7 乾燥ベタインの KBr 共存下の IR スペクトル (ペースト法)

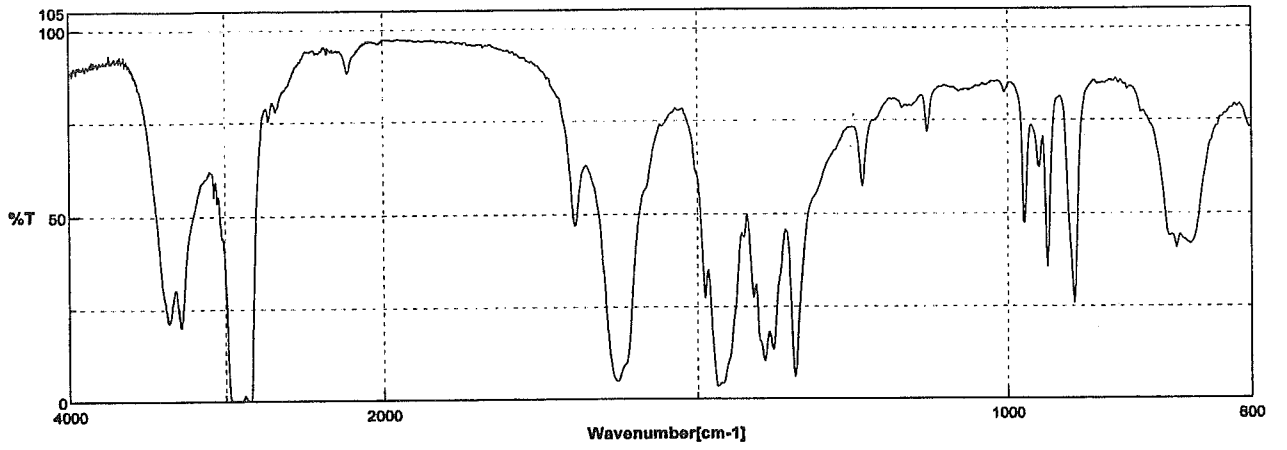


Fig. 8 乾燥ベタインの KCl 共存下の IR スペクトル (ペースト法)

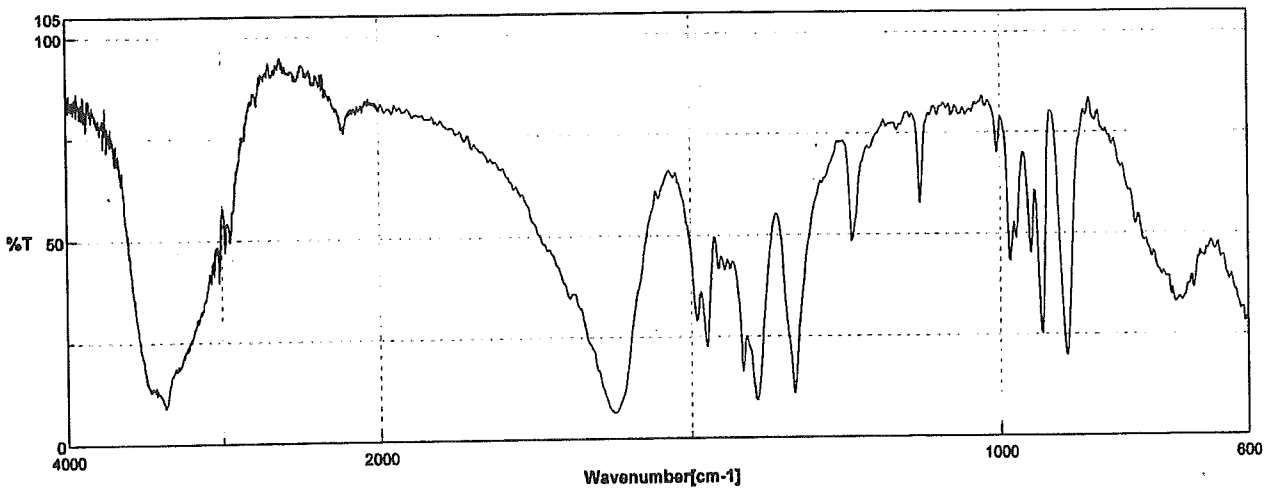


Fig. 9 乾燥ベタインの IR スペクトル (KBr 法, 擦り合わせ不十分)



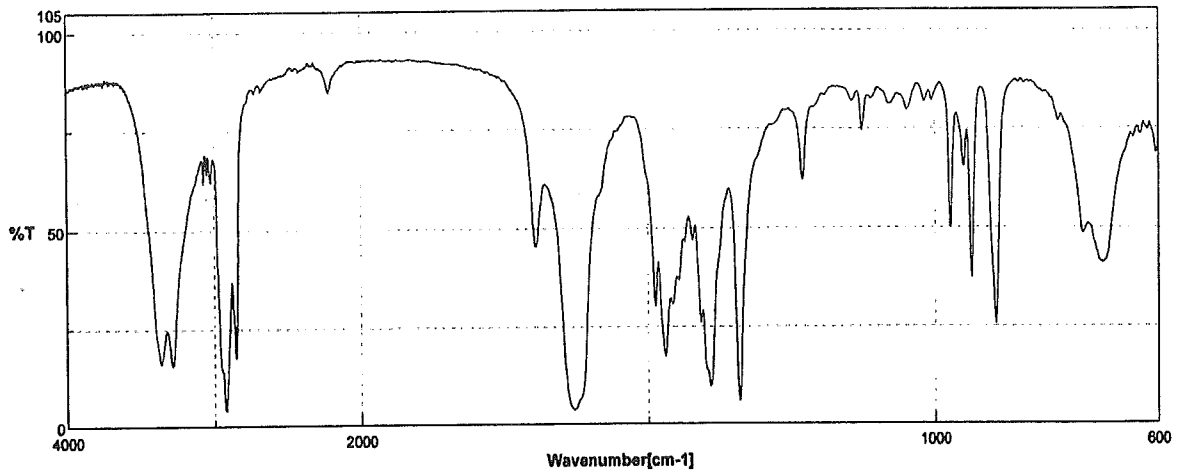


Fig. 10 ベタイン（製品，日本甜菜製）の IR スペクトル（ペースト法）

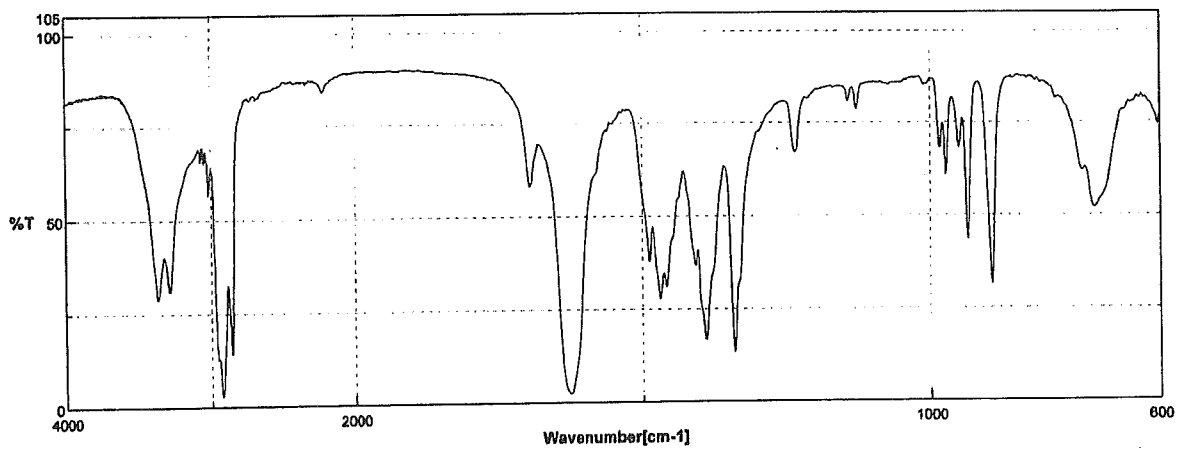


Fig. 11 ベタイン（製品，ダニスコ製）の IR スペクトル（ペースト法）

82754 CAS [590-47-6]  
BETAINE Free Base Monohydrate

FW 135.2

3289.4 1487.6 936.1  
1694.9 1399.1 891.7  
1629.7 1343.0 700.3

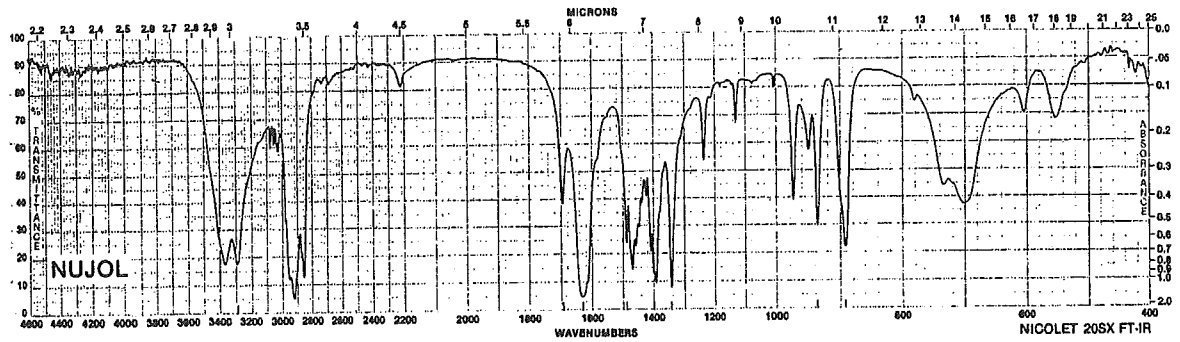


Fig. 12 ベタイン-水和物の IR スペクトル (ペースト法)

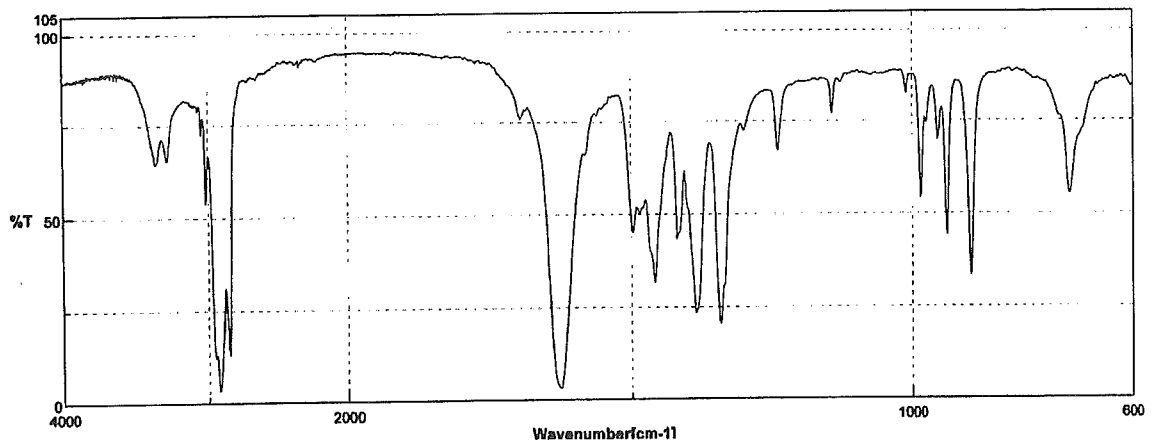


Fig. 13 乾燥ベタイン (日本甜菜製) の IR スペクトル (ペースト法)

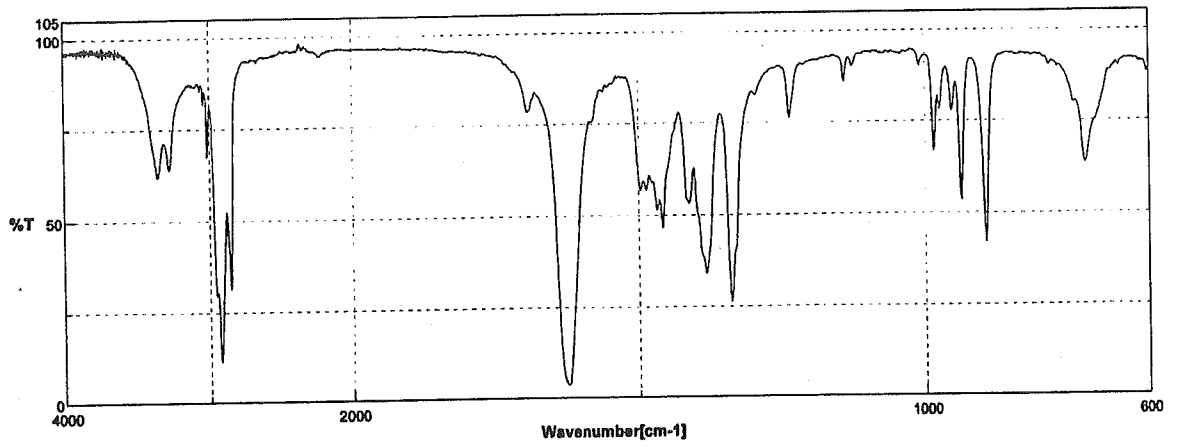


Fig. 14 乾燥ベタイン (ダニスコ製) の IR スペクトル (ペースト法)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究

平成 17 年度分担研究報告書

食品添加物の複合分析法に関する研究

—既存添加物クチナシ青色素の安定同位体を用いた構造解析—

分担研究者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官  
協力研究者 多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

既存添加物クチナシ青色素の主成分の生成過程およびその化学構造について、安定同位体を分子内に含むモデル化合物  $^{15}\text{N}$ -ベンジルアミンにより有機合成を行い、LC/MS を用いて検討した。 $^{14}\text{N}$ -ベンジルアミンとの反応生成物を LC/MS により比較したところ、クチナシ青色素の主色素成分が、クチナシ由来のゲニピンと R-NH<sub>2</sub> が反応し、次にその生成物が繰り返し重合して生成することが推察された。クチナシ青色素中の構造未知の主色素成分の構造解析には、安定同位体を用いた分析が有効であることが確認された。

A. 研究目的

合成添加物および既存添加物中の主成分の分析や食品中の添加物の分析には、液体クロマトグラフ/質量分析装置(LC/MS)が近年一般的に利用されるようになった。これは、MS を検出器とすることによって分子量情報や部分構造情報が得られることから、従来から用いられてきたフォトダイオードアレイ(PDA)に比べ、化合物の同定が容易であり、また検出感度も非常に高いことによる。しかし、食品中を含むあらゆるものからの化合物の同定は、分析対象とする化合物の化学構造が既知である場合に限られ、構造未知の化合物の同定と構造決定は、今なお現実的には不可能である。そこで本研究においては、構造未知の食品添加物の LC/MS を利用した構造解析に焦点を絞り、その可能性について検討することとした。

既存添加物収載品目リストに収載されるクチナシ青色素は、「クチナシの果実から得られたイリドイド配糖体とタンパク質分解物の混合物に  $\beta$ -グルコシダーゼを添加して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」

と定義されている。また、クチナシ赤色素は：定義「クチナシの果実から得られたイリドイド配糖体のエステル加水分解物とタンパク質分解物の混合物に  $\beta$ -グルコシダーゼを添加して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」と定義されている。

クチナシ(*Gardenia jasminoides* Ellis)の果実にはクチナシ黄色素の主色素であるクロシン(crocin)と呼ばれるカロテノイド配糖体が含まれるが、その他色素成分以外にイリドイド配糖体のゲニポシド(geniposide)が含まれている。クチナシ青色素と赤色素はゲニポシドを原料としてアミノ酸などと重合して生成したものである。両色素の公開特許情報によれば、その製造過程は Fig. 1 に示す様に提出されている。すなわち、ゲニポシドを酵素的加水分解し、得られたゲニピン(genipin)にアミノ酸など 1 級アミン(R-NH<sub>2</sub>)を加えて反応させると反応生成物が重合を繰り返すことによってクチナシ青色素が生成する。一方で、ゲニポシドをアルカリ加水分解してゲニポシド酸(geniposidic acid)を得(単離はしない)、更にもう一度アルカリ加水分解して得られるゲニピン酸

(genipic acid)にアミノ酸など1級アミン(R-NH<sub>2</sub>)を加えて反応させると反応生成物が重合を繰り返してクチナシ赤色素が生成すると記載されている。よって、公開特許情報によれば、基質のイリドイドがカルボン酸メチルエステル(= genipin)であるかカルボン酸(= genipic acid)であるかの違いのみにより、青色素と赤色素が生成すると提案されている。しかし、赤色素の生成ルートでは、ゲニポシド(geniposide)をアルカリ加水分解してゲニポシド酸(geniposidic acid)を得ているが、イリドイド類はアルカリ性条件に非常に弱く分解されやすいため、Fig.1に示すとおり加水分解反応が進行するとは考えにくい。実際にゲニピン(genipin)を genipic acid に収率よくアルカリ加水分解することも困難である。よって、クチナシ赤色素はアルカリ加水分解時に生成する未知成分とアミノ酸が反応して生成すると考えられるが他に情報はない。

現時点では、クチナシ青色素と赤色素中の主色素成分の化学構造を決定した報告はなく、したがって、両色素の公的な確認試験法や食品中の分析法も存在しない。

そこで、クチナシ青色素の主色素成分の生成過程および反応生成物の化学構造を明らかとする目的で、反応出発原料となるゲニピン(genipin)とベンジルアミンを用いてモデル実験を行い、反応生成物について、LC/MSにより検討したので報告する。

## B. 研究方法

### 1) 試料

ゲニピン(genipin)(G)および<sup>14</sup>N-ベンジルアミン(<sup>14</sup>N-benzylamine)(<sup>14</sup>B)は和光純薬製、<sup>15</sup>N-ベンジルアミン(<sup>15</sup>N-benzylamine)(<sup>15</sup>B)は日本酸素製、溶媒は市販試薬を用いた。

### 2) 装置

液体クロマトグラフ/質量分析装置(LC/MS): Waters 社製 LC/MS system (LC, Alliance 2695; PDA, 2996; MS, ZQ-4000)。

### 3) LC/MS 分析条件

LC 条件 1: カラム, Atlantis-HILIC (2.1x150 mm, Waters); カラム温度, 40°C; 移動相, 90% CH<sub>3</sub>CN (0 min) - 0% CH<sub>3</sub>CN (50 min) (0.1% HCOOH included); 流速, 0.2 mL/min; 注入量, 4 μL; PDA, 192-800 nm; 検出波長, 600, 680 nm.

LC 条件 2: カラム, YMC-Pack-C8-AP (2.1x150 mm, YMC); カラム温度, 40°C; 移動相, 10% CH<sub>3</sub>CN (0 min) - 100% CH<sub>3</sub>CN (50 min) (0.1% HCOOH included); 流速, 0.2 mL/min; 注入量, 4 μL; PDA, 192-800 nm; 検出波長, 600, 680 nm.

LC 条件 3: カラム, YMC-Pack-CN (2.1x150 mm, YMC); カラム温度, 40°C; 移動相, 10% CH<sub>3</sub>CN (0 min) - 100% CH<sub>3</sub>CN (50 min) (0.1% HCOOH included); 流速, 0.2 mL/min; 注入量, 4 μL; PDA, 192-800 nm; 検出波長, 600, 680 nm.

MS 条件: ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 350 °C; 脱溶媒ガス, 350 L/h; コーンガス, 50 L/h; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 30 V (ESI pos.); スキャン範囲, *m/z* 100-2000. HILIC

### 4) LC/MS 分析試料の調製

<sup>14</sup>N-ベンジルアミン(<sup>14</sup>B)または<sup>15</sup>N-ベンジルアミン(<sup>15</sup>B)(0.1 mmol)とゲニピン(0.1 mmol)を EtOH (5 mL)に溶かし、封管中、90°Cで5時間反応させた。反応液に水(50 mL)を加え、0.5 M HClで弱酸性に調製した後、AcOEt (50 mL)で3回抽出したものを合わせ、LC/MS 分析試料とした。

## C. 結果及び考察

### 1) モデル化合物の合成

市販のクチナシ青色素はクチナシ果実中に含まれるイリドイド配糖体のゲニポシドとアミノ酸類を反応させて製造したものである(Fig. 1)。反応に用いられるアミノ酸は、多くの場合、製造コスト削減のためにタンパク加水分解物を用いている。よって、市販のクチナシ青色素中の色素成分は、様々なアミノ酸との反応物からなる複雑な混合物であり、それぞれを単離することは非常に

困難である。また、クチナシ青色素は、水によく溶けるが有機溶媒には全く溶けない。

そこでまず、生成物の単離を容易にするために、ゲニピン(G)とグリシン(glycine)を反応させたところ、市販のクチナシ青色素と同等の青色素が得られたが、有機溶媒に全く不溶であった(Fig. 2-(1))。よって、他のアミノ酸との反応生成物も同様に有機溶媒に不溶であると予想されたため、通常の水と有機溶媒を用いた LC による分析は不可能であると考えられた。

そこで、モデル実験としてゲニピン(G)とベンジルアミン(benzylamine)を反応させて生成した化合物の構造解析を行うこととした。ベンジルアミン(benzylamine)を用いる利点は、1. 反応生成物の有機溶媒への溶解性を高める。2. 重合反応の進行過程でベンゼン環が立体障害となり、比較的重合度が小さな化合物を与える。3.  $^1\text{H}$ -または  $^{13}\text{C}$ -NMR で分析する際にベンゼン環のシグナルの積分値から重合度を換算できる。ことがあげられる。

また、安定同位体を分子内に持つ  $^{15}\text{N}$ -ベンジルアミン( $^{15}\text{B}$ )を反応に用いた。LC/MS により、 $^{14}\text{N}$ -ベンジルアミン( $^{14}\text{B}$ )を反応させた生成物と比較することによって生成物の分子中の窒素の数を推定すること可能であるとともに重合度を推定することも可能である。例えば、反応生成物が、ゲニピン(G)にベンジルアミン(B)が等量導入されたものの重合体であるとき、それぞれの分子量が測定できれば、 $(\text{G}+^{15}\text{B})_n - (\text{G}+^{14}\text{B})_n = \text{重合度}(n)$ の式が成り立つ (Fig. 2-(2))。

実際に、ゲニピン(G)と  $^{14}\text{N}$ -または  $^{15}\text{N}$ -ベンジルアミン( $^{14}\text{B}$  or  $^{15}\text{B}$ )をエタノール中で反応させたところ、メタノール、エタノール、酢酸エチル等の有機溶媒に可溶性青色素が生成した。この青色素は、市販のクチナシ青色素と同等の色合いを示したことから、クチナシ青色素の生成過程と同様な反応経路により生成したものと考えられ、青色素の分子構造を推定するためのモデル化合物になり得ると判断した。

## 2) LC/MS 分析

ゲニピン(G)とベンジルアミン(B)から生成した青色素のLC/MS分析条件を検討した。まず、通常のODSカラムを用いて、各種移動相による溶出条件の検討を行ったが、生成した青色素は分子量が非常に大きいためか、ODSカラムを通過しなかった。そこで、順相条件として親水性相互作用クロマトグラフィー(Hydrophilic Interaction Chromatography = HILIC)カラムを、また、逆相条件としてシアノプロピル(CN)カラムおよびオクチル(C8)カラムを用いて分析条件を検討した。HILICカラムは、逆-逆相クロマトグラフィーまたは水系順相クロマトグラフィーとしての挙動を示し、化合物の極性が強くなる順に溶出する。CNカラムは逆相でも順相でも使用できる固定相であり、シアノプロピル固定相は移動相中の有機溶媒濃度を変化させるだけで、逆相モード領域からヒリックモード領域に変化する稀な固定相である。C8カラムは逆相クロマトグラフィーとして用いられ、ODSカラムと比べて化合物の保持力が弱い。

ゲニピン(G)とベンジルアミン(B)から生成した青色素の検出波長 600, 680 nm におけるクロマトグラムを Fig. 3, 4 に示した。検出波長 600 nm において、HILICカラムでは、保持時間約 9.6, 15.3, 20.9, 24.9 分にピークが観察された(Fig. 3A)。各ピークの PDA スペクトルに顕著な差はなく 600-700 nm に極大吸収を持つものであった。また、HILICカラムなどの順相条件では、最小骨格が等しく、それが繰り返し重合した化合物の場合、分子量が小さいものから溶出されることが知られていることから、観察されたピークは、同様の最小基本骨格を持っていると考えられ、約 10 分のピークを仮にモノマーとすると、15 分のピークがダイマー、21 分のピークがトリマー (あるいはテトラマー) に相当するものと推定された。一方、CNカラムでは保持時間 20-35 分にブロードした大きなピークの上いくつかのピークが観察された(Fig. 3B)。また、保持時間が異なるが、C8カラムでも同様なパターンで観察された(Fig. 3C)。これは CNカ

ムおよび C8 カラムでは高度に重合した重合化合物もほぼ同時に溶出しているためと考えられた。

次に、検出波長 680 nm において観察したところ、HILIC カラムでは 15.4 分に、CN カラムでは 24.1 分に、C8 カラムでは 32.0 分に大きなピークが 1 本ずつ観察された(Fig. 4 peak X). このピーク X は 680-690 nm に極大吸収を持つものであり、ピーク強度も強いことから、ゲニピン(G)とベンジルアミン(B)から生成した青色素の主成分である可能性が高いと考えられた。そこでピーク X について MS 情報を収集することとした。

### 3) 安定同位体を用いた構造推定

ピーク X を示した化合物の構造情報を得るために、ゲニピン(G)と  $^{14}\text{N}$ -または  $^{15}\text{N}$ -ベンジルアミン( $^{14}\text{B}$  or  $^{15}\text{B}$ )より生成した青色素を LC/MS に付し、観察された MS スペクトルを比較した(Fig. 5)。 $^{14}\text{N}$ -または  $^{15}\text{N}$ -ベンジルアミン( $^{14}\text{B}$  or  $^{15}\text{B}$ )を用いた反応物は、同じ条件で反応させると同一構造の化合物を与えるはずであるから、観察される MS スペクトルの差は、分子中あるいはフラグメント中の N の数を示す。ピーク X の MS シグナルを測定した結果、ゲニピン(G)と  $^{15}\text{N}$ -ベンジルアミン( $^{15}\text{B}$ )より生成したもの( $\text{B}+^{15}\text{N}$ )では  $m/z$  555.6, ゲニピン(G)と  $^{14}\text{N}$ -ベンジルアミン( $^{14}\text{B}$ )より生成したものの( $\text{B}+^{14}\text{N}$ )では  $m/z$  553.5 にシグナルが観察された。よって、両者のシグナルを比較すると、 $m/z$  2.1 の差が見られたことから、分子中には、N が 2 つ含まれていることが推察された。また、 $\text{B}+^{14}\text{N}$  および  $\text{B}+^{15}\text{N}$  の  $m/z$  値の小数点以下の値が .5, .6 を示し、整数値を示さないことから、観察されたシグナルが多価イオンによるものとも考えられた。したがって、ピーク X を示す化合物の分子内には、N 原子が 2 個入っているものの n 重合体であることが予想された。

### 4) 推定構造

Fig. 6 に現在までに報告されているクチナシ青色素の中間体の構造式を示した。いずれの文献もゲニピンとメチルアミン、ゲニピンとグリシンを

用いて、モデル実験を行い構造推定したものである。報告されている化合物はすべて、反応に用いたメチルアミンあるいはグリシンを分子内に含み、重合したものである。

今回、ゲニピンとベンジルアミンを用いてモデル実験を行った反応生成物も同様に分子内にベンジルアミンを含み、それが重合したものと予想される。しかし、報告されている中間体の構造と同様な化合物を与えると仮定して、ベンジルアミンが反応した生成物の分子量を計算したところ、ピーク X を示した化合物の  $m/z$  に相当するものはなかった。また、クチナシ青色素の分子量に関する文献では、青色素本体の分子量は 3000~30000 としている。したがって、本研究においても、ゲニピンとベンジルアミンから Fig.7 に示すようなステップで青色素が生成していると考えられるが、構造を確定することはできなかった。MS スペクトルからは、分子内に N を二つ含むもの化合物の重合体と予想され、今後、各種クロマトグラフにより単離し、NMR 等のスペクトルデータを解析することで構造が確定可能であると思われる。

### D. 結論

クチナシ青色素の分析法を確立するために、主色素成分の構造について検討した。安定同位体を分子内に含む  $^{15}\text{N}$ -ベンジルアミンを用いてモデル化合物を合成し、LC/MS により構造を推定した。

### E. 研究発表

#### 1) 論文発表

Sugimoto, N., Yomota, C., Furusho, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR) to the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavoring agent. Food Addit. Contam. submitted. (2006).

#### 2) 学会発表

Sugimoto, N., Yomota, C., Furusho, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Application of liquid

chromatography-nuclear magnetic resonance  
(LC-NMR) to the identification of  
ethylmethylpyrazine, a food flavoring agent.

Pacificchem 2005, Honolulu (Hawaii), 15-20, Dec.  
(2005).



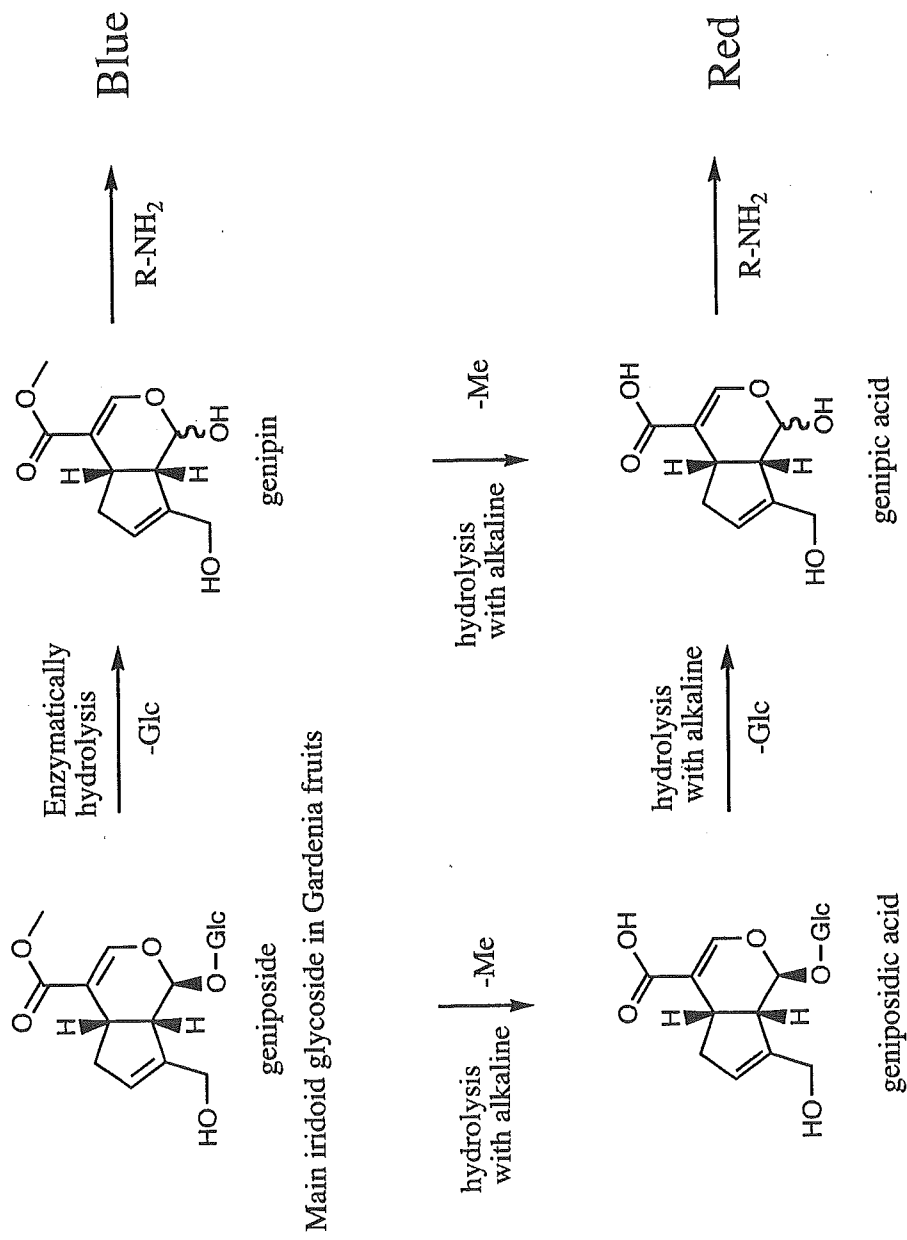


Fig. 1 Proposed generation mechanism of Gardenia blue and red

This scheme is summarized from publications of Japanese patent applications for Gardenia blue and red.

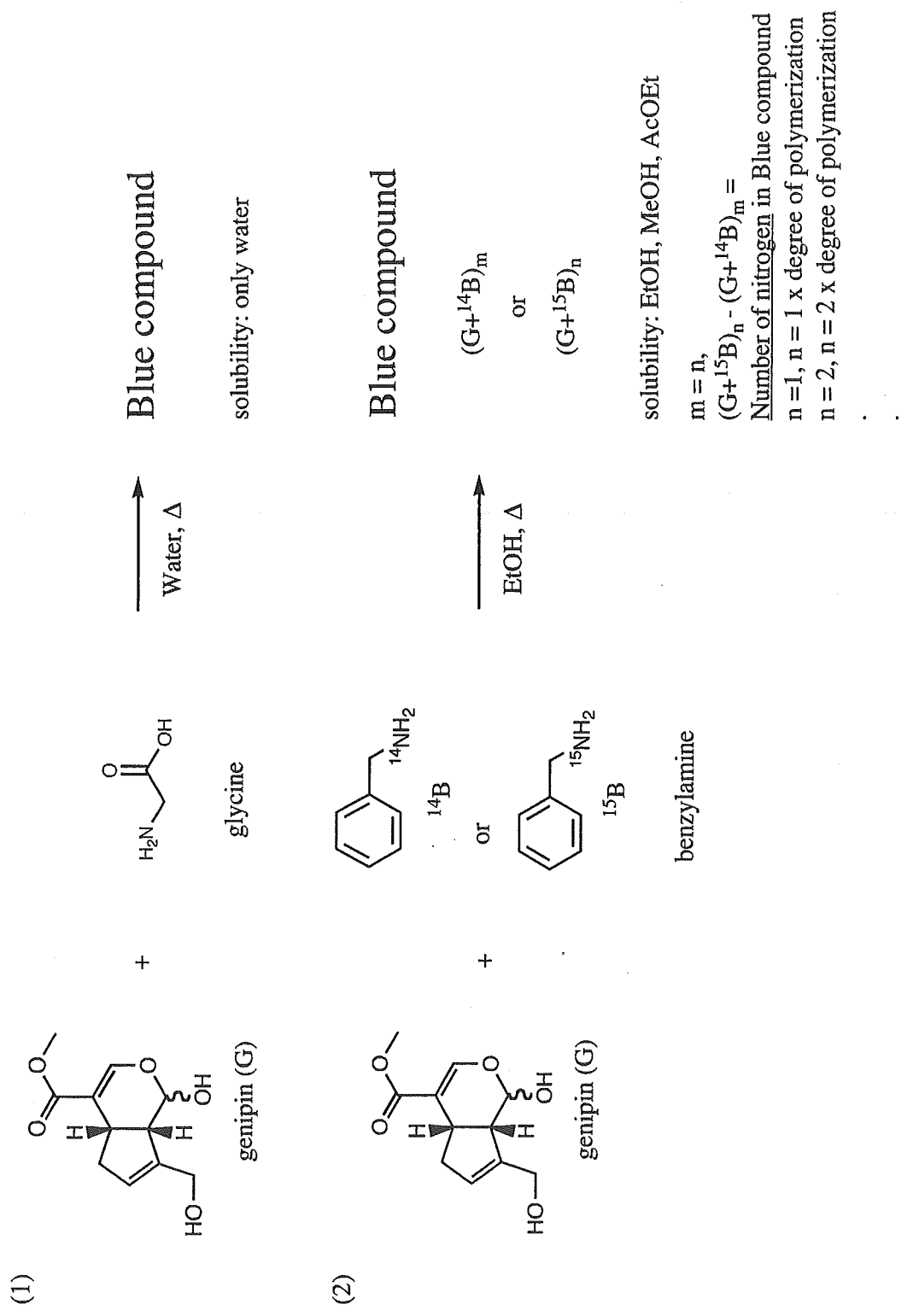


Fig. 2 Strategy of determination of blue compound

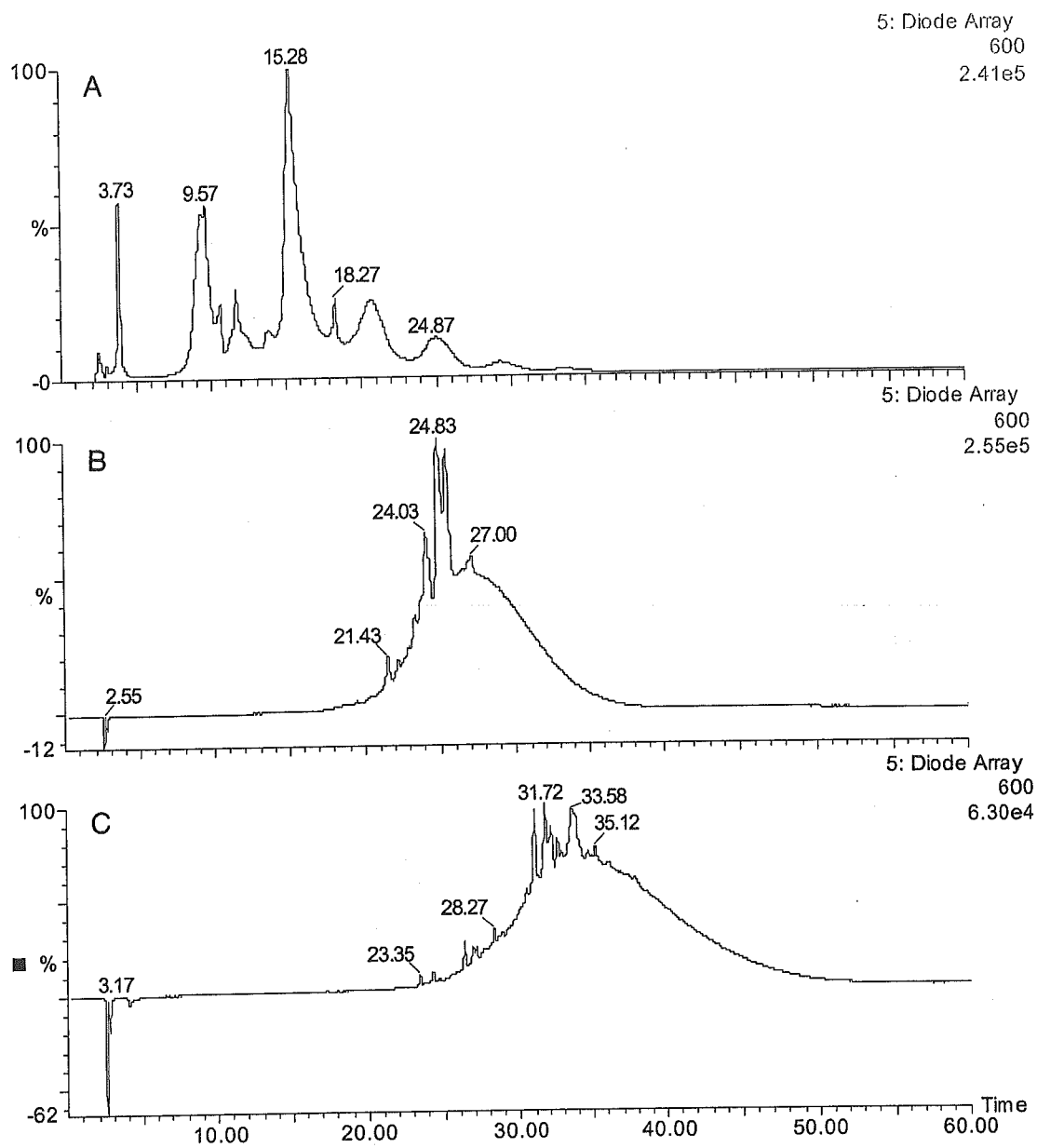


Fig. 3 Comparison of LC conditions  
 Detect, 600 nm; A) HILIC column (LC Conditions 1). B) CN column (LC  
 Conditions 3). C) C8 column (LC Conditions 2).

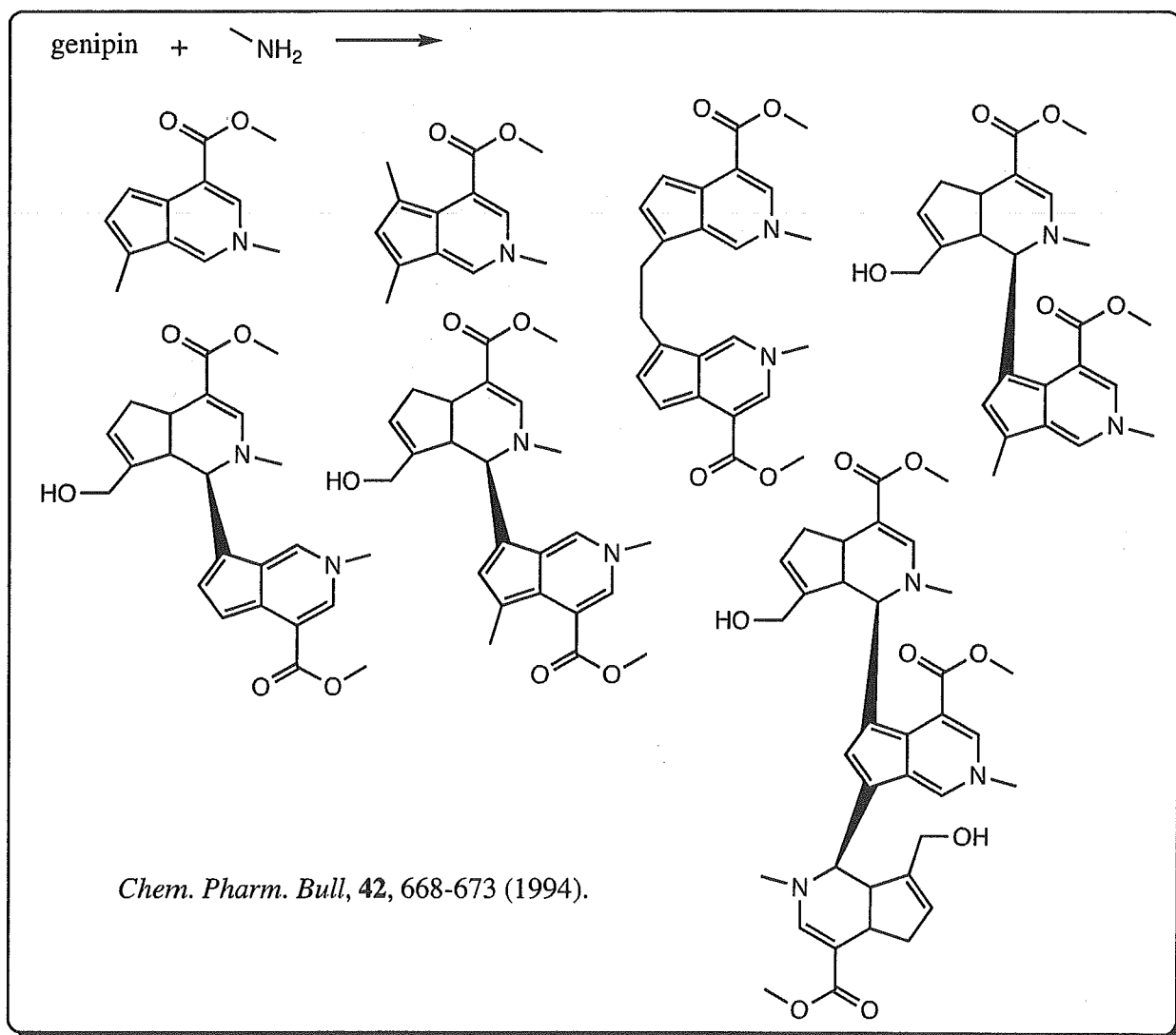
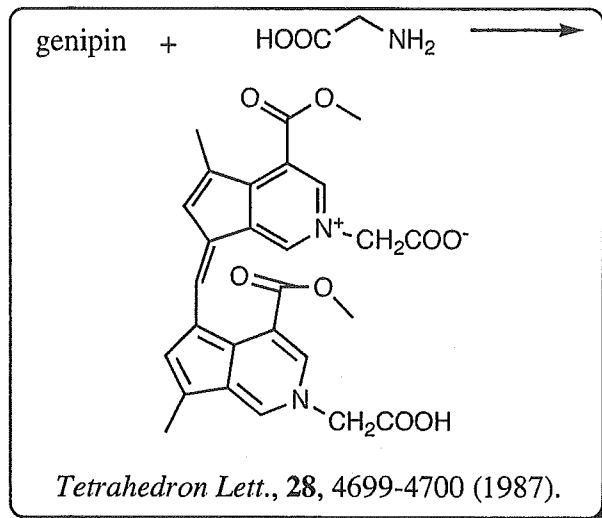
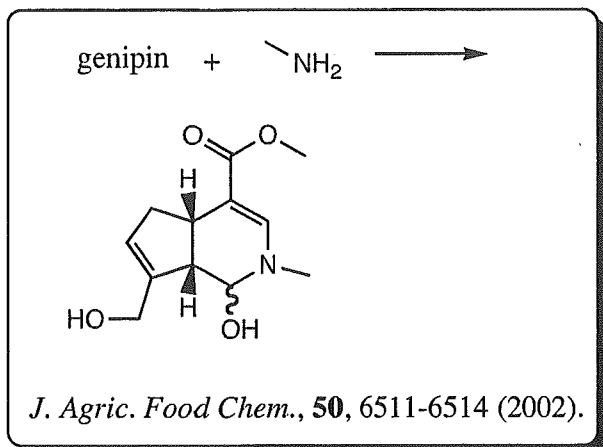


Fig. 6 Reported intermediates of Gardenia blue