

グナルしか観測されなかったことと比較すると、**2**の構造は**1**の1置換体であると考えられた。<sup>13</sup>C分析を行った結果、16の炭素シグナルが観測された。HMQC分析の結果と合わせると、4級炭素が4個、酸素が結合した3級炭素（またはカルボン酸）が8個、水素が結合した3級炭素が3個、そしてケトンと考えられる炭素が1つ観測された。HMBC分析を行った結果、3つの水素からのHMBC相関によって、**1**の構造は容易に確認された（Fig. 8）。すなわち、2つのフロログルシノール骨格と、それを架橋するグリオキシル酸の構造である。この時点で、ケトンと考えられる炭素、および酸素が結合した、あるいはカルボン酸と考えられる炭素の2つが未決定であった。上述の分析結果から、この2つの炭素はケトカルボン酸を形成しており、そしてフロログルシノールの $\delta 105.4\text{ppm}$ の4級炭素に結合していると考えられた。すなわち、**2**の構造は**1**に $\alpha$ -ケトカルボン酸が置換した構造と推定された。推定構造の分子量は361であり、これはESI-MS分析の結果と一致する。またESI-MS分析のフラグメントから予想された2つのカルボン酸も一致する。酸アルコールによって容易にエステル化されていたカルボン酸は、このケトカルボン酸と考えられる。ケトカルボン酸が結合した構造は**1**に比べて共役結合が延びるため、**2**の極大吸収波長が**1**より長いことを説明する。

ケトカルボン酸が置換したフロログルシノールは、クエルセチンの酸化分解物として報告されている。そのため、**2**もまた**1**同様に、クエルセチンの酸化分解物から形成されるという仮説に一致する。このように、**2**の構造は**1**にケトカルボ

ン酸が置換した構造であることが証明されたが、1位の炭素、カルボン酸およびケトカルボン酸の3つの化学シフトについてはHMBC相関が得られないため、アサインすることができなかった。しかしながら、これは今回の一連の構造決定には支障はない。残念ながら、現時点で置換基の位置が**1**の2位なのか4位なのかは判明しなかった。さらなる研究の継続が必要である。今回の結果は、タマネギ外皮の複雑な色素組成は、cepaic acid置換体によって形成されている可能性が示唆された。

#### D. 総括

タマネギの乾燥外皮から、赤色の新規色素を単離精製した。マススペクトルおよびNMR分析の結果、新規色素はcepaic acidにケトカルボン酸が置換した構造であることが判明した。本構造は色素の吸収波長および色素形成の観点からも支持されるものであり、タマネギ外皮中の色素成分はcepaic acidの置換体によって形成されていることを示唆した

#### E. 参考文献

- 1) Yusai Ito, Naoki Sugimoto, Takumi Akiyama, Takeshi Yamazaki, Kenichi Tanamoto "Cepaic acid, a novel yellow xanthylum pigment from the dried outer scales of yellow onion *Allium cepa*" *Tetrahedron Letters*, 50, 4084-4086(2009).

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
  2. 学会発表 2件
- 1) 伊藤裕才, 坂本祐実, 山崎壮, 穂山浩

「黄色タマネギ乾燥外皮の黄色色素の形成における酸化過程の必須性」日本農芸化学 2012 大会（京都），2012 年 3 月，口頭発表

- 2) 坂本祐実，伊藤裕才，佐野明，山崎壮，  
穂山浩「黄色タマネギ乾燥外皮由来の新規色素の単離と構造決定」日本農芸化学 2012 大会（京都），2012 年 3 月，  
口頭発表

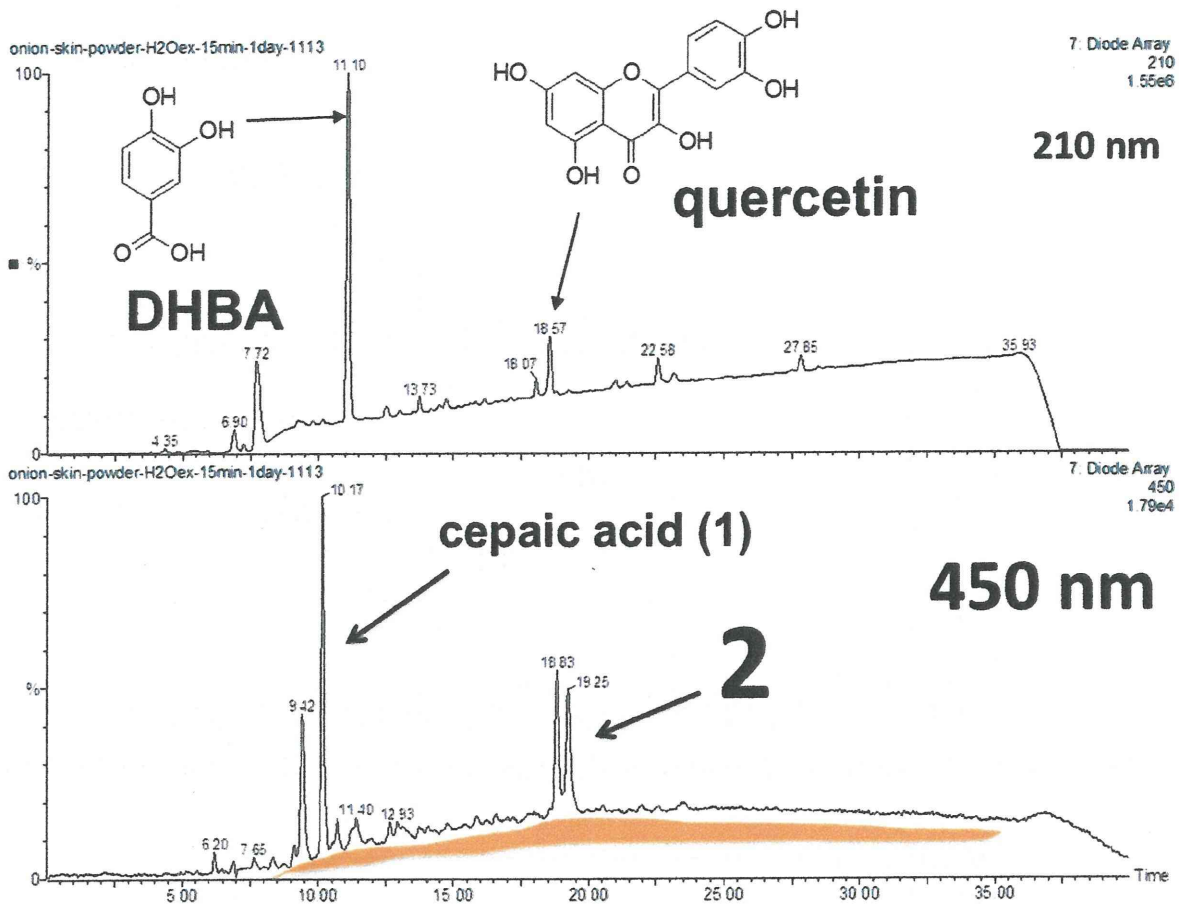


Fig. 1 RP-HPLC charts of the extract of the dried outer scales of yellow onion *Allium cepa*.

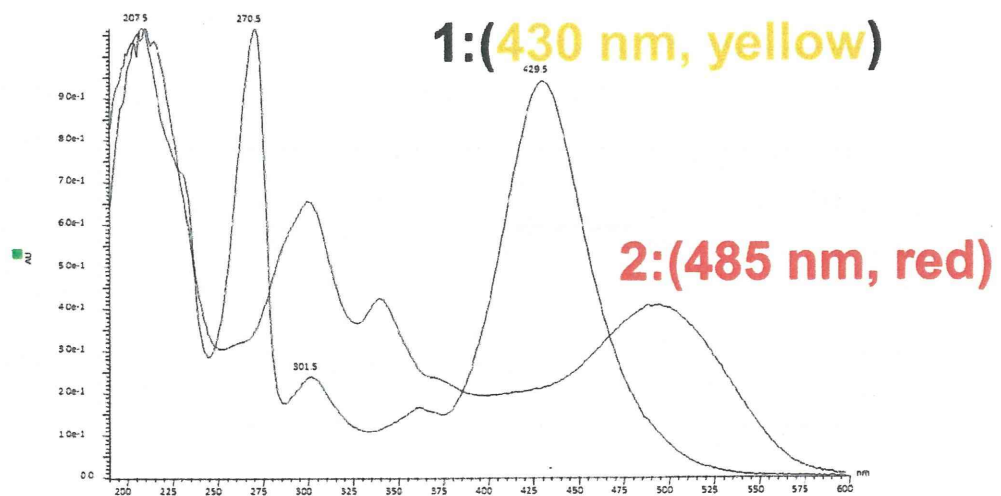


Fig. 2 UV.-Vis spectra of cepaic acid (1) and a new red pigment (2) in H<sub>2</sub>O

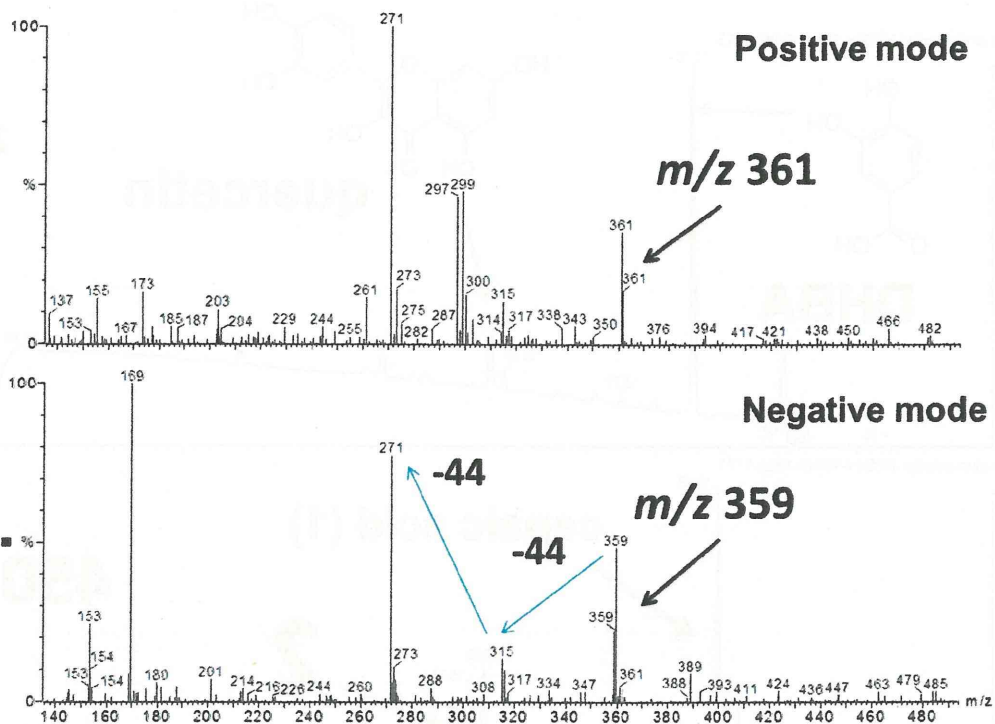


Fig. 3 ESI-MS spectra (positive and negative modes) of a new pigment (2)

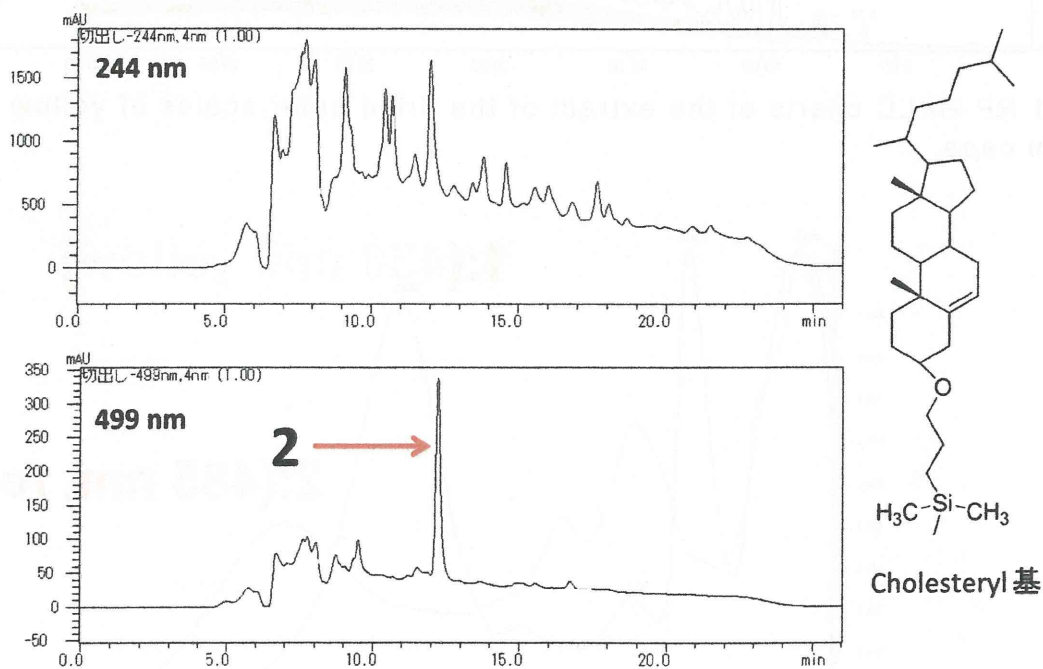


Fig. 4. HPLC separation of the crude extract using Cholesteryl column

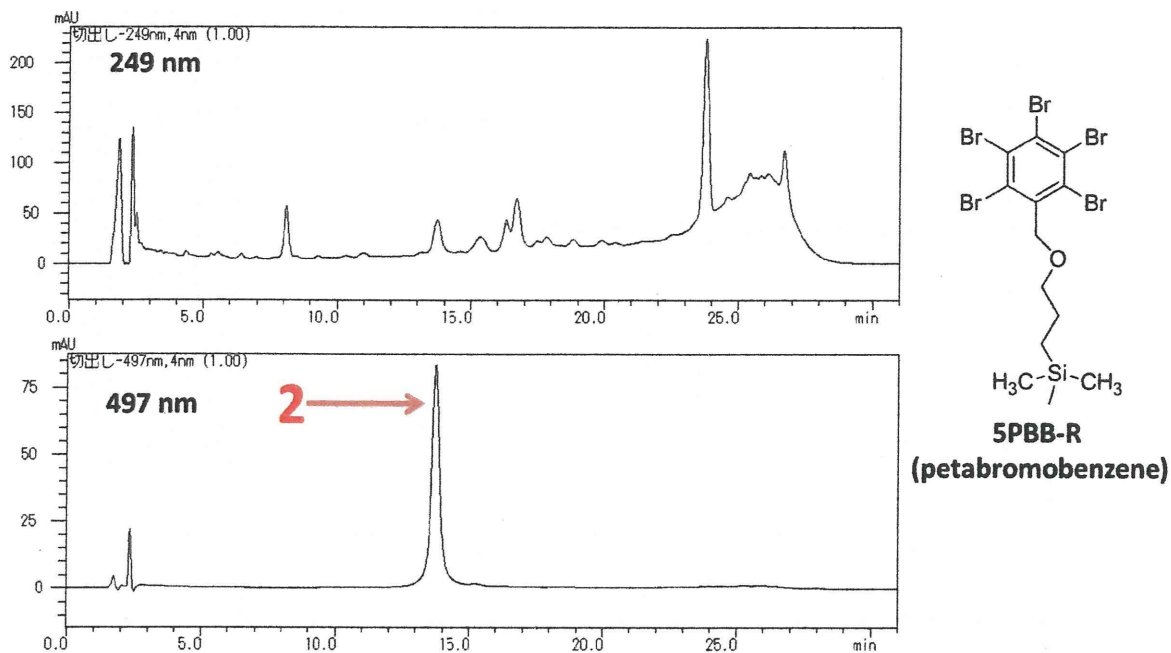


Fig. 5 HPLC purification of a new pigment (2) using 5BB-R column

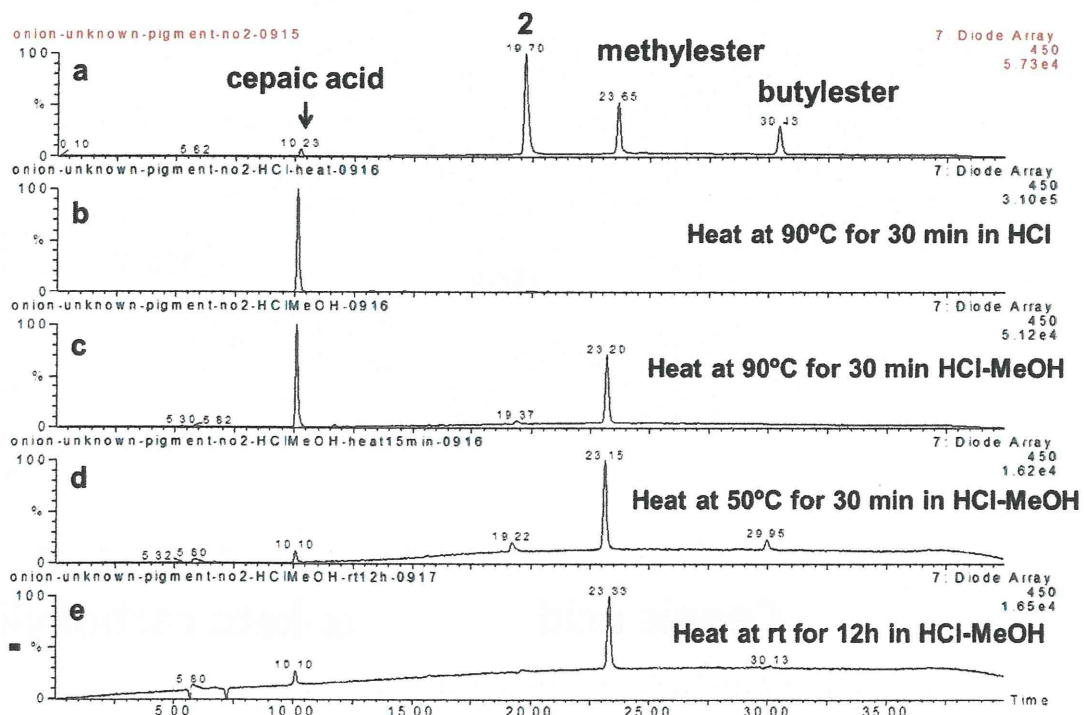


Fig. 6: The degraded and esterified compounds of 2 under acid-condition.

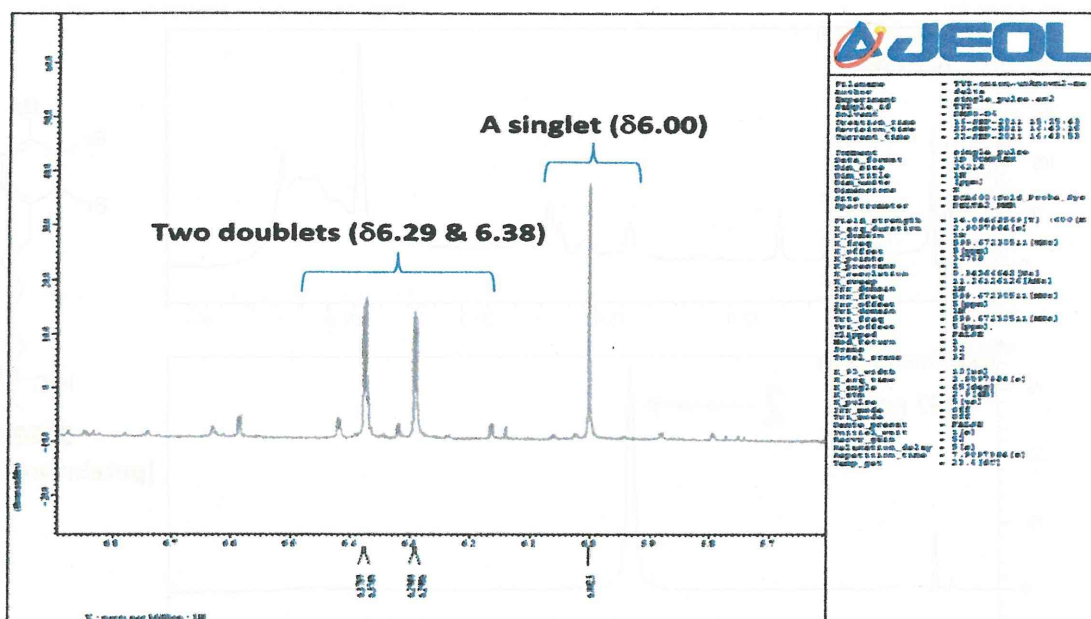


Fig. 7 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of purified 2 in DMSO-*d*<sub>6</sub>/TFA (600 MHz)

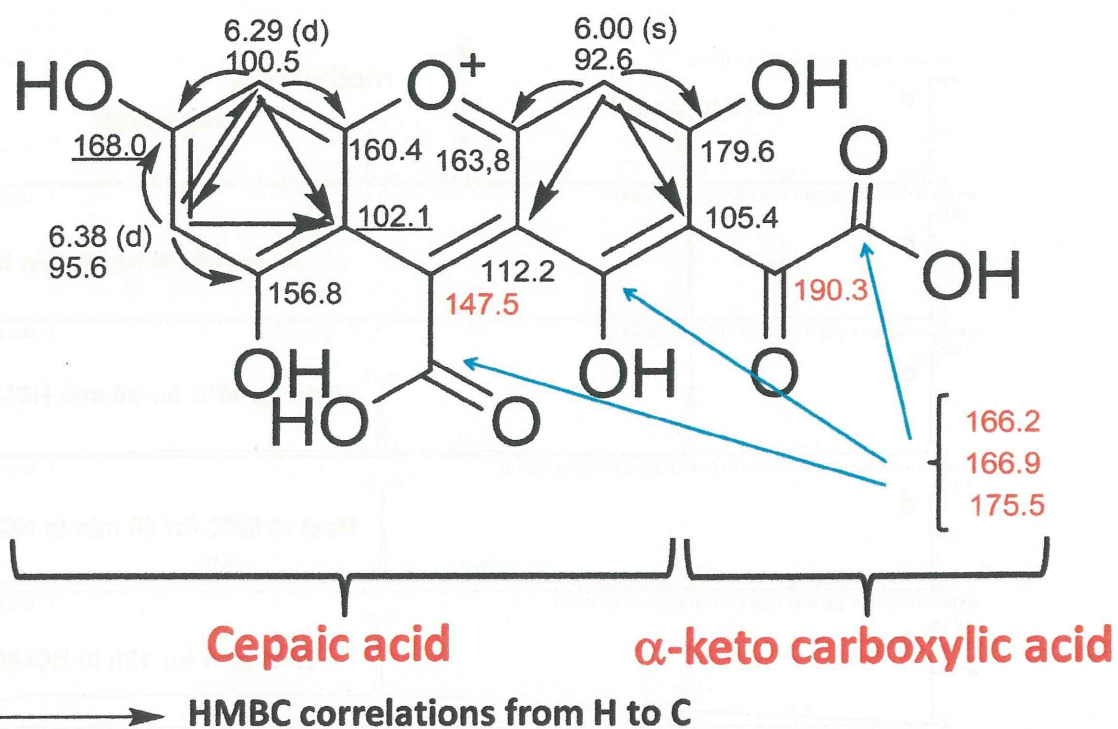


Fig. 8 Proposed structure of a novel pigment (2) constructed by HMBC correlations

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
既存添加物の品質評価と規格試験法に開発に関する研究  
平成23年度分担研究報告書

既存添加物クチナシ青色素の色素生成メカニズムの解明：  
ゲニピンと各種アミノ酸から生じる青色素の色調の差異に関する研究

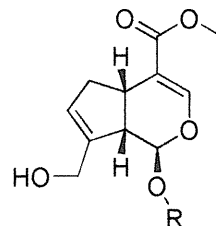
研究協力者 伊藤裕才 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨 既存添加物クチナシ青色素は、クチナシの果実に含まれるイリドイド配糖体ゲニポシドを $\beta$ -グルコシダーゼでゲニピンとした後、タンパク質分解物と反応させることで得られる。これまでの報告から、本反応はゲニピンが水溶液中でジアルデヒド構造に開裂し、タンパク質分解物中のアミノ基と反応すると考えられているが、添加するタンパク質分解物によって色調に差異があることが報告されている。この差異はタンパク質分解物中のアミノ酸やペプチドの構造に依存するのではないかと考えられた。そこで今回我々は、タンパク質に含まれる通常アミノ酸20種および生体内に含まれる異常アミノ酸8種をゲニピンと1:1で反応させ、生成した青色素について紫外可視部の吸収スペクトルを測定した。その結果、色素間で極大吸収波長および吸光度に大きな差異がみられた。特に $\beta$ -アラニンやタウリン等の非 $\alpha$ -アミノ酸類から得られた青色素は、短い極大吸収波長と高い吸光度で強い青みを示した。またリシン等の塩基性アミノ酸も強い青みを示した。一方で酸性アミノ酸やシステインの発色の発色は弱かった。ゲニピンとアミノ酸における青色素の発色には、アミノ酸の側鎖構造が強く関わっていることが示唆された。

#### A. 研究目的

クチナシ(*Gardenia jasminoides* ELLIS)は、日本西南部から中国、フィリピンにわたる温暖地に自生する常緑低木である。夏期には白い花を咲かせ、強い芳香を持つ。このクチナシ果実を原料とした3つの着色料（クチナシ青色素、クチナシ赤色素、クチナシ黄色素）が既存添加物として認可されている。クチナシ黄色素の主色素は果実に含まれるカロテノイド「クロセチン(crocetin)」および、その配糖体である「クロシン(crocin)」である。一方、クチナシ青色素およびクチナシ赤色素の主色素は、天然由来の色素ではなく、果実

に含まれる無色のイリドイド配糖体「ゲニポシド(1, geniposide)」を原料に、 $\beta$ -グルコシダーゼおよびタンパク質分解物を反応させた得られたものである。この点が同じクチナシの名を冠していても、クチナシ黄色素とは大きく違う点である。<sup>1)</sup>



geniposide (1): R = glucose  
genipin (2): R = H

クチナシ青色素は、種々の色素との混色性の良さから、主に黄色素と混合した緑色素や赤色素と混合した紫色素として、飲料や菓子、農産加工品、水産加工品、畜産加工品等に利用されている。またクチナシ赤色素も pH による色調変化が少ないことから、飲料、餡、麺類、菓子、ゼリー、乳製品など広い用途に使用でき、ワイン色、ブルーベリー色、グレープ色、苺色など自然な色合いの演出に利用されている。<sup>1)</sup>

クチナシ青色素は食品添加物公定書において「クチナシ (*Gardenia augusta* MERRILL var. *grandiflora* HORT., *Gardenia jasminoides* ELLIS) 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えられたものをいう。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」と定義される。すなわち、ゲニポシド(1)を  $\beta$ -グルコシダーゼを用いてアグリコンのゲニピン(2, genipin)に加水分解した後、タンパク質分解物と反応させることで、青色素が生成される (Fig. 1)。青色素の形成メカニズムは完全に解明されてはいないが、糖の脱離で得られるゲニピンのヘミアセタール構造が、水溶液中でジアルデヒド構造に開裂し、タンパク質分解物中のアミノ基とカルボニル-アミノ反応を起こした後閉環し、酸化反応を伴って連鎖的に分子間で重合することで形成されると推定されている (Fig. 2)<sup>2) and 3)</sup>。カルボニル-アミノ反応は1級アミノ基特有であり、2級以上のアミノ基は反応しない。重合反応は酸素の存在下で連鎖的に進行するため、構造解明が可能な低分子色素の単離は困難である。<sup>3)</sup>そのため、色素の化学構造についてはなお不明な点が多い。ゲニピンとグリシン (Gly) のモル比 1 : 1 の混合物から得られた 2 量体の genipocyanin G1 だけが構造決定され

た青色素の唯一の報告例である (Fig. 3)。<sup>4)</sup>

クチナシ赤色素は、ゲニポシドのメチルエステルをカルボン酸へと加水分解後、 $\beta$ -グルコシダーゼ処理で得られるゲニピン酸 (genipinic acid) に、タンパク質分解物を反応させることで得られる (Fig. 1)。ゲニピン中のメチルエステルをカルボン酸にすることで、重合時に分子内で脱炭酸反応が起こり、反応生成物の共役結合が短くなるため、青色素ではなく赤色素が形成されると推定されている。

上で述べたように、ゲニピンのカルボニル-アミノ反応は1級アミノであれば進行するため、反応機構の研究においては、主にメチルアミンやグリシン等の分子量の小さいアミンが用いられてきた。しかしながら、既存添加物クチナシ青色素およびクチナシ赤色素の製造は、「タンパク質分解物」に限られている。タンパク質分解物の成分は、アミノ酸やペプチドであり、ゲニピンまたはゲニピン酸は、アミノ酸やペプチドの N 末端のアミノ基、または塩基性アミノ酸の側鎖のアミノ基と反応して色素形成すると考えられる。これまでに、添加するタンパク質分解物によって、クチナシ青色素および赤色素の色調に差異が生じることがあると、製造側から報告されている。タンパク質分解物が基原や分解方法によって様々な成分組成をもつためと考えられるが、これは色素の色調が1級アミノ基だけで決まるのではなく、アミノ基の先の化学構造にも影響をうけることを示唆している。すなわち、タンパク質分解物の場合は、反応する末端アミノ酸の構造が発色に大きく関係していると考えられる。

そこで本研究では、タンパク質に含まれる 20 種のアミノ酸に生体に含まれる異常アミノ酸 8 種を加えた 28 種のアミノ酸 (Fig. 4) を



ゲニピンと反応させて青色素を生成し、それぞれ紫外可視部吸収スペクトルを測定し、極大吸収波長および吸光度の値から、アミノ酸間における色調の違いについて比較検討し、クチナシ青色素形成のメカニズムについて知見を深めることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

ゲニピン (genipin,  $C_{11}H_{14}O_5$ , 分子量 226.23,) は和光純薬工業 (株) より購入した。緩衝液用のリン酸二水素ナトリウム ( $NaH_2PO_4$ ) はシグマアルドリッチ社より、リン酸水素二ナトリウム ( $Na_2HPO_4$ ) は和光純薬工業 (株) から購入した。呈色実験に供した L 型の通常アミノ酸類 (20 種類) はシグマアルドリッチ社より購入した。アスパラギン酸 (Asp, aspartic acid), グルタミン酸 (Glu, glutamic acid), リシン (Lys, lysine), アルギニン (Arg, arginine), ヒスチジン (His, histidine), グリシン (Gly, glycine), アラニン (Ala, alanine), バリン (Val, valine), ロイシン (Leu, leucine), イソロイシン (Ile, isoleucine), セリン (Ser, serine), トレオニン (Thr, threonine), システイン (Cys, cysteine), メチオニン (Met, methionine), アスパラギン (Asn, asparagine), グルタミン (Gln, glutamine), プロリン (Pro, proline), フェニルアラニン (Phe, phenylalanine), チロシン (Tyr, tyrosine), トリプトファン (Trp, tryptophan)。異常アミノ酸類 (8 種) は和光純薬より購入した。 $\beta$ -アラニン ( $\beta$ Ala,  $\beta$ -alanine),  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA,  $\gamma$ -aminobutanoic acid), オルニチン (Orn, ornithine), タウリン (Tau, taurine), メチオニンスルホキシド (MetO, DL-methionineSulfoxide), アミノアジピン酸

(Aaa, 2-Aminoadipic acid), アントラニル酸 (Anta, anthranilic acid), ホスホセリン (pSer, phosphoserine)。

全ての実験において水は MilliQ 水を用いた。

### 2. 装置

紫外可視分光光度計 (日本分光株式会社製, V-650)

### 3. 呈色反応

1) リン酸二水素ナトリウムおよびリン酸水素二ナトリウムを用いて、0.1M リン酸緩衝液 pH7.0 を調製した。

2) ゲニピン溶液 (4mM) は次のように調整した。ゲニピン (45.25mg) を精密に量りとり、0.1M リン酸緩衝液 pH7.0 に溶解し、50mL のメスフラスコでメスアップした。

3) タンパク質に含まれる通常アミノ酸 20 種と生体成分である異常アミノ酸 8 種の合計 28 種のアミノ酸について、それぞれ 4mM 溶液 (20mL) を作製した。粉末試料を精密に量りとり、上記の 0.1M リン酸緩衝液で溶解し、それぞれ 20mL にメスアップした。

4) 10mL ネジ付き試験管にゲニピン水溶液 2,500  $\mu$ L および各アミノ酸水溶液 2,500  $\mu$ L を加え、モル比 1 : 1 の混合液を作成した。加熱による蒸発を防ぐため、または蒸気が試験管内に流入するのを防ぐためにネジ付き試験管を用いた。混合液の入った試験管をネジ栓で密封し、70°C の水浴中で反応開始から 270 分まで加熱し、青色に発色させた。

### 4. 紫外可視吸収スペクトルの測定

混合液の紫外可視部吸収スペクトルを継時的に測定した。測定には 20 倍希釈した検液を調製して供した (混合液 250  $\mu$ L + リン酸緩衝

液 4,750  $\mu$ L)。対照液にはリン酸緩衝液を用いた。測定は反応開始後 30 分, 90 分, 150 分, 210 分, 270 分の 5 回行い, 発色が飽和に達したことを確認した。各アミノ酸につき試験を 3 回繰り返して行った。

### C. 結果および考察

クチナシ青色素の呈色反応は, ゲニピンのジアルデヒド構造とタンパク質分解物中の末端のアミノ基によるカルボニル-アミノ反応により開始されると考えられている。そこで, タンパク質に含まれる 20 種の L 型アミノ酸を反応基質として用いた。さらには, メチオニンスルホキシドやホスホセリンのように側鎖が修飾されたアミノ酸や, タンパク質には含まれないが, 生体中に多く存在する異常アミノ酸類 ( $\beta$ -アラニン, オルニチン等) も加えた。タウリンは厳密な意味ではアミノ酸ではないが (含硫アミノ酸), 胆汁内に胆汁酸との複合体として多く存在し, また  $\beta$ -アラニンとの比較するためにも試験に加えた。アントラニル酸はアミノ基に直接結合した芳香環の影響を検討するために加えた。

既存添加物「クチナシ青色素」の製法は, イリドイド配糖体ゲニポシドから, まず  $\beta$ -グルコシダーゼでグルコースを脱離させてゲニピンとするが, 本試験ではゲニポシドからでなく市販試薬のゲニピンを用い, 中性のリン酸緩衝液中でゲニピンとアミノ酸をモル比 1 : 1 の割合で混合し, 70  $^{\circ}$ C の湯浴で加熱することで青色の呈色を行った。呈色の進行は, 30 分, 90 分, 150 分, 210 分, 270 分と継時的に測定し, 紫外可視部吸収スペクトルにおける吸光度の増加が飽和に達することを確認した。全てのアミノ酸において, 呈色反応は速やかに進行し, 反応開始後 3~4 時間で

呈色反応は飽和に達し終結した。例として Lys の紫外可視吸収スペクトルの時間変化および, 3 回の繰り返し試験による再現性を Fig. 5 に示した。継時的に色素量が増加し, 210 分で飽和に達しているのが観察される。

興味深いことに, アミノ酸の種類によって, 呈色に大きな差がみられた。リシン (Lys) とグルタミン酸 (Glu) の呈色の差を写真で示した (Fig. 6)。また Lys, Gly, Phe, Ser, Glu, Asp における反応開始から 270 分後の吸収スペクトルを比較した (Fig. 6)。ゲニピンと各アミノ酸はモル比 1:1 で混合されているにも関わらず, Lys と Glu のようにアミノ酸の種類によって発色に視覚的レベルで明確な差が観察された。ゲニピンと各アミノ酸類から生成した青色素の飽和に達した吸収スペクトルの極大吸収波長および吸光度の結果を Table 1 に示した。当然ながら, Pro のアミノ基は 1 級でなく 2 級であるため, 色素形成は進行しなかった。多くのアミノ酸は, 590~600nm に極大吸収が観測されたが, 極大吸収波長が最も長かったものは, アントラニル酸 (Anta) 由来の色素であり, 605nm に極大吸収が観測された。一方で極大吸収波長が最も短かったのは  $\beta$ -アラニン ( $\beta$ Ala) 由来で 572.8nm に観測された。アントラニル酸が最も極大吸収波長が長かった理由は, アミノ基が芳香環に直接結合しているためと考えられる。また脂肪族の側鎖を有するアミノ酸類 Leu, Ile, Val, Ala, Gly,  $\beta$ Ala, GABA を比較すると, 側鎖が短く, そしてアミノ基とカルボン酸基が離れるほど吸収波長は短くなることが示された。また Lys, Orn のような塩基性アミノ酸も低波長側に極大吸収が観測された。

各アミノ酸の極大吸収波長における吸光度の比較を Fig. 7 に示した。最も吸光度が高

かった反応物は、タウリン由来であったが、タウリン同様のβアミノ酸構造をもつβAlaやγアミノ酸であるGABAも高い吸光度を示した。塩基性アミノ酸のLys, Ornも高い値を示した。塩基性アミノ酸は分子内に2つの1級アミノ基を含むため、高い反応性をもつ可能性が示唆された。

各アミノ酸による生成した色素の極大吸収波長および吸光度をプロットした(Fig. 8)。同じ性質を持つアミノ酸同士、たとえば, AsnとGln, AspとGlu, LysとOrn, は、極大吸収波長および吸光度共に類似した結果を示し、アミノ酸の側鎖構造と青色への発色には相関性が存在することが示された。

非α-アミノ酸は、より低波長(570~580nm)の範囲に極大吸収波長を示し、また反応終点における吸光度は高く、強い発色を示した。また分子内に2つの1級アミノ基を有するLysやOrnも低波長に極大吸収波長をもち、高い発色を示すことがわかった。反対に、芳香族アミノ酸の極大吸収波長は597~605nmの範囲で、吸光度が低い値であることがわかった。興味深いことに、システインは、化学構造の相似したセリンに比べて吸収強度が低かった。この2つのアミノ酸の違いは、側鎖末端がヒドロキシル基(Ser)かチオール基(Cys)かではない。また、同じ硫黄原子を含むメチオニンとメチオニンスルホキシドは波長と吸光度共に近い値であったのに対し、システインの吸光度は非常に小さく、発色が弱いという結果が得られた。これらのことから、メカニズムは不明であるが、アミノ酸側鎖の官能基によって発色に大きく変化があることが示唆された。高い吸光度を示すものほど、短い極大吸収波長を示す傾向が観測されたが、吸光度と極大吸収波長との間に関係があるかは今回の研究だけでは証明できなかった。

。今後はクロマトグラフィーを用いた反応生成物の比較、特に生成した色素の重合度の比較が必要と考える。

#### D. 総括

本研究では、クチナシ青色素の原料であるイリドイドのゲニピンと、タンパク構成アミノ酸を中心とした28種のアミノ酸を反応させて青色素を形成し、各色素の極大吸収波長および吸光度の分析を行った。その結果、青色素の発色は、添加するアミノ酸の種類によって明確な違いあることが観察され、側鎖の構造および官能基によって発色の強度及び極大吸収波長に大きく差異が出ることも判明した。非α-アミノ酸であるタウリン、β-アラニン、または塩基性アミノ酸から生成した青色素は、低波長側に極大吸収波長を示し、高い吸光度を示した。一方で、酸性アミノ酸やシステインから生成した色素の吸光度は低く、青色の発色が弱かった。今回得られた結果は、クチナシ青色素の発色のメカニズムに有用な知見となると同時に、より青みの強いクチナシ青色素を製造する際に、有益な情報になるものと考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) 米田雅彦, クチナシ色素, 別冊フードケミカル, **10**, 58-61(2008)
- 2) 井上謙一郎, Pseudoazulene 骨格を有する天然由来青色色素について, 岐阜薬科大学紀要, **42**, 1-12(1993)
- 3) Jee-Eun Park, Jae-Youn Lee, Hong-Gyu Kim, Tae-ryong Hahn, Young-Sook Paik, Isolation and Characterization of Water-soluble Intermediates of Blue Pigments Transformed

from Geniposide of Gardenia Jasminoides,  
*JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, **50**,  
6511-6514 (2002)

4) Shigeaki Fujikawa, Yuko Fukui, Kunimasa Koga,  
Structure of Genipocyanin G1, a spontaneous  
reaction product between genipin and glycine,

*Tetrahedron Letters*, **40**, 4699-4700 (1987)

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

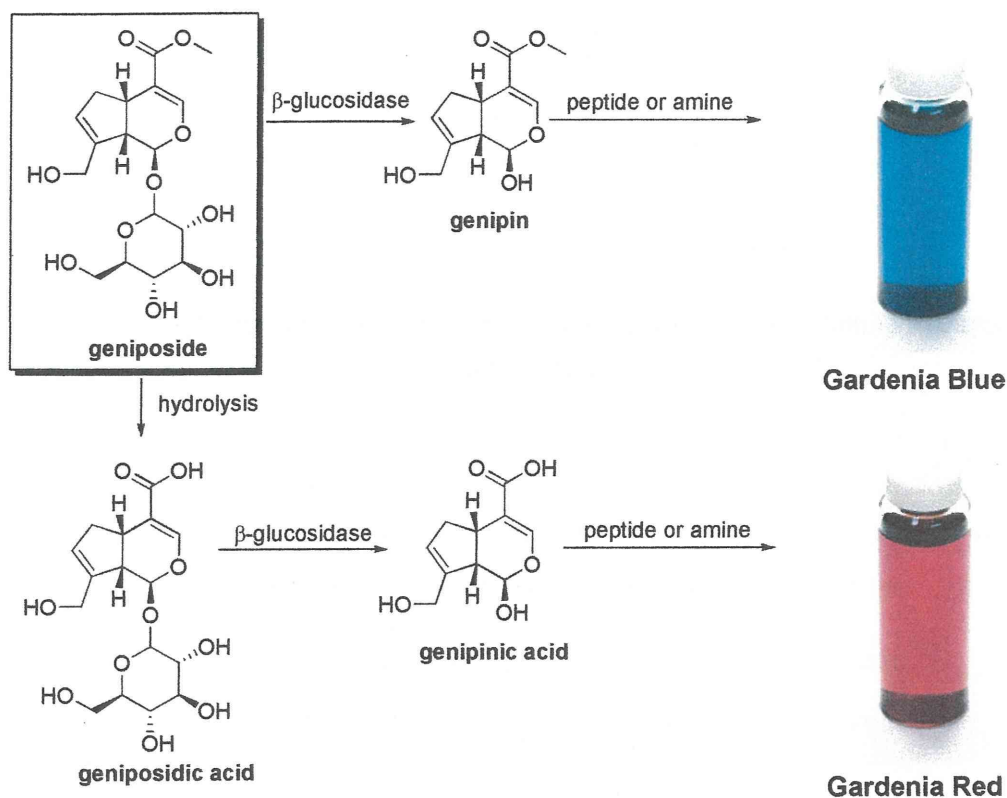


Fig. 1 Scheme of the formation from geniposide to two colorants; Gardenia Blue (クチナシ青色素) or Gardenia Red (クチナシ赤色素).

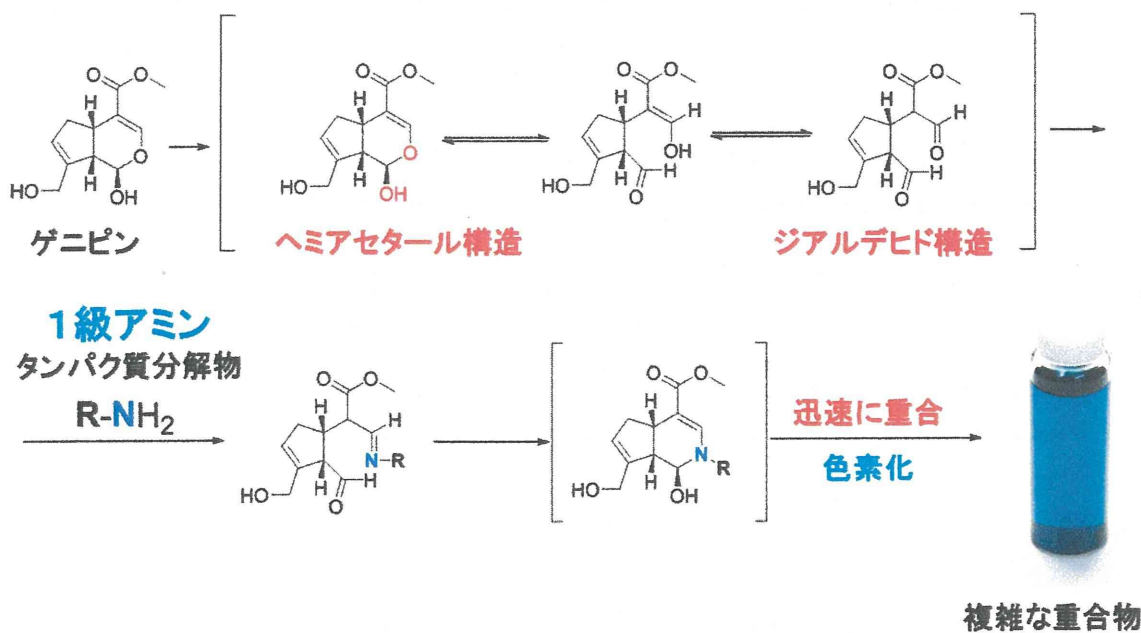
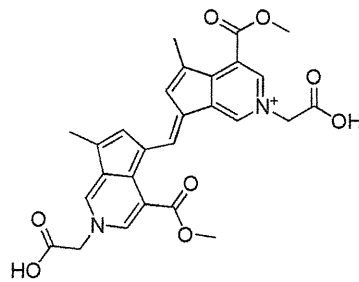
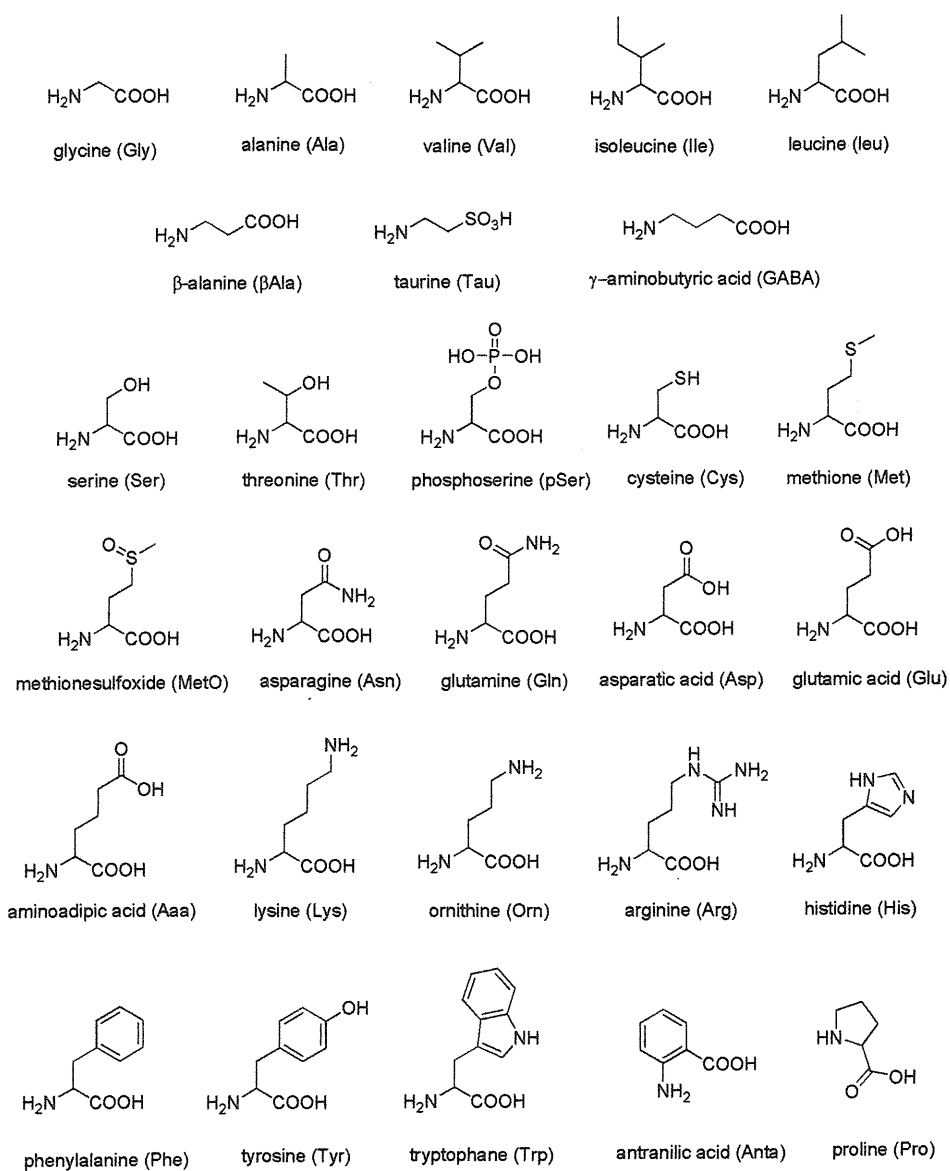


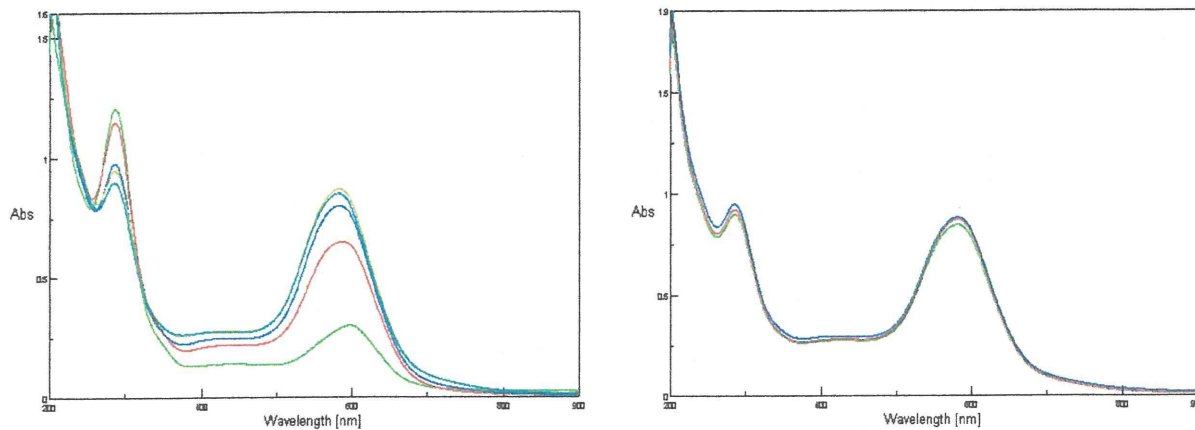
Fig. 2 Proposed reaction mechanism between genipin and a primary amine to produce blue pigments



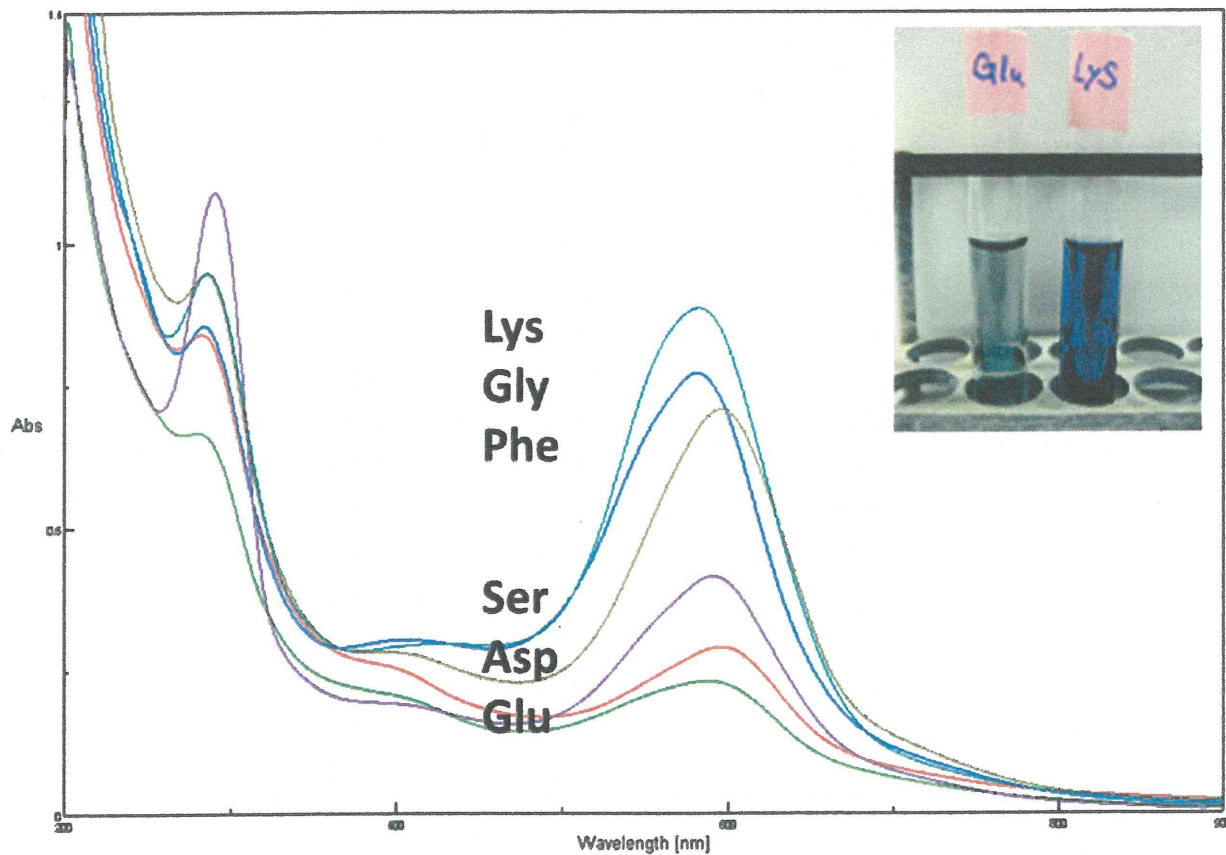
**Fig. 3** Structure of genipocyanin G1, the blue pigment produced by the reaction between genipin and glycine (Gly)



**Fig. 4.** Structures of 28 amino acids (20 usual and 8 unusual amino acids) provided for this study



**Fig. 5** UV-Vis. spectra of blue pigment produced by the reaction between genipin and lysine (Lys). Left: Time-course change of spectra (30, 90, 150, 210 and 270 min). Right: Spectra of three samples (each 270 min)



**Fig. 6:** Comparison of UV-Vis. spectra of blue pigments produced by the reaction between genipin and 6 amino acids (Lys, Gly, Phe, Ser, Asp and Glu).

**Table 1.**  $\lambda_{\max}$  and its absorbance of each blue pigment produced by the reaction between genipin and 28 amino acids

amino acids	nm	Abs
Gly	582.0	0.774
Ala	586.7	0.505
Val	594.3	0.741
Leu	593.0	0.364
Ile	594.5	0.437
Cys	596.0	0.111
Met	594.8	0.623
MetO	596.2	0.578
Glu	596.3	0.365
Asp	595.7	0.328
Aaa	588.0	0.258
$\beta$ Ala	572.8	1.131
GABA	575.3	0.988
Tau	580.0	1.360
Gln	594.8	0.436
Asn	594.3	0.478
Arg	592.5	0.644
Lys	582.5	0.867
Orn	580.2	0.954
Ser	591.8	0.358
Thr	600.5	0.348
pSer	597.0	0.320
Phe	597.0	0.684
Tyr	598.2	0.597
Trp	602.8	0.466
Anta	605.0	0.313
His	598.8	0.233
Pro	0.0	0.000



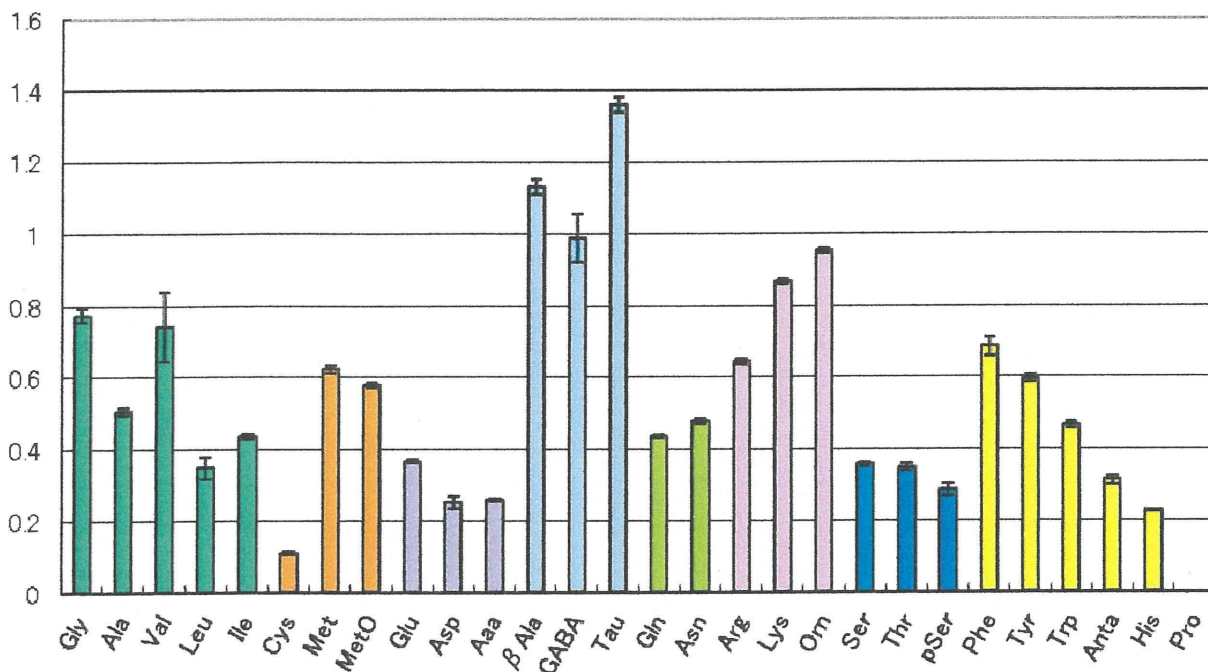


Fig. 7 Comparison of absorbance at  $\lambda_{max}$  of blue pigments generated from genipin and 28 amino acids

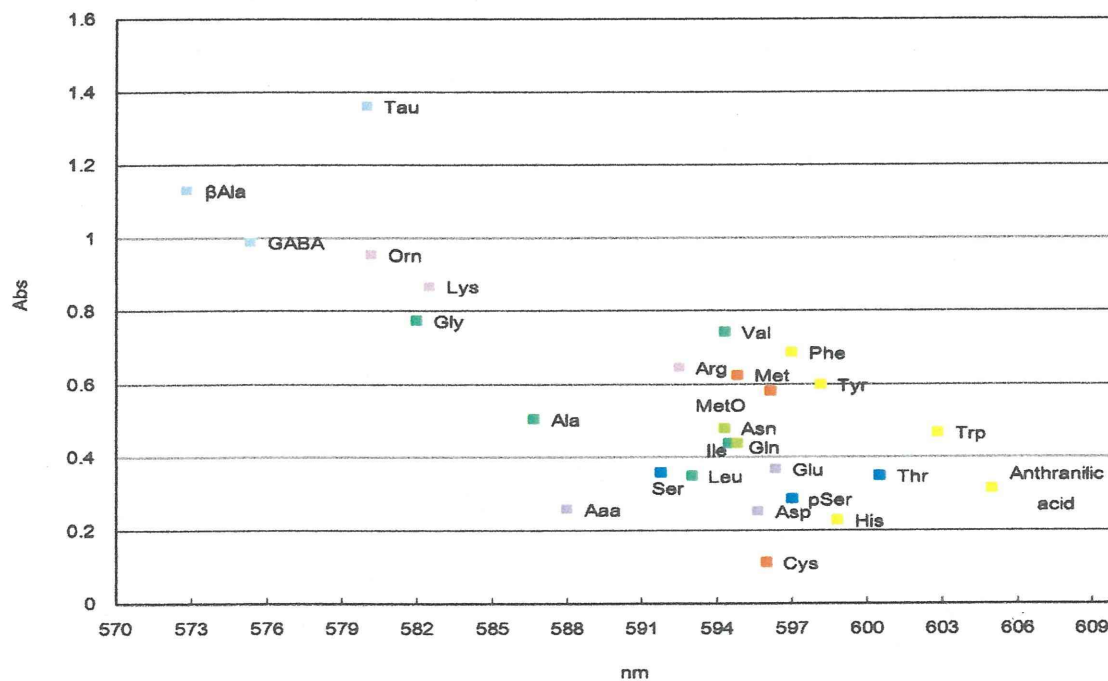


Fig. 8 Two-dimensional plots about  $\lambda_{max}$  and its absorbance of each blue pigment produced from genipin and 28 amino acids

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 23 年度分担研究報告書

## 既存添加物ブドウ果皮抽出物の成分研究

研究分担者 天倉 吉章 松山大学薬学部 准教授

### 研究要旨

既存添加物名簿に記載されている製造用剤「ブドウ果皮抽出物」の品質規格作成のための化学的検討として、ブドウ果皮抽出物製品中の含有成分について検討を行った。まず、製品試料溶液を HPLC 分析したところ、大きなブロードピークとともに複数の明瞭なピークが観察された。それらを明らかにするため、各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、13 種の化合物 (tryptamine, syringic acid, vanillic acid, ethyl gallate catechin, epicatechin, luteoliflavan, quercetin, quercetin 3-O-glucuronide, myricetin 3-O-glucoside, procyanidin B-1, procyanidin B-2, procyanidin B-5 or 8) を単離することができた。一方、大きなブロードピークについては、縮合型タンニン（プロシアニジン）オリゴマー画分と考えられ、同様に分離精製を行い、その画分を得ることができた。そのオリゴマーの構造的特徴については、現在解析中である。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 助教

吉田 隆志 松山大学薬学部 教授

### A. 研究目的

既存添加物名簿収載品目リストに記載されている製造用剤として、ブドウ果皮抽出物の定義には、「アメリカブドウ又はブドウの果皮から得られた、ポリフェノールを主成分とするものをいう」とあり、基原・製法・本質には、「ブドウ科アメリカブドウ (*Vitis labrusca* Linne) 又はブドウ科ブドウ (*Vitis vinifera* Linne) のうち、生食用又は醸造用ブ

ドウの甲州、シャルド若しくはリースリング種の果皮搾粕より、室温時又は微温時エタノールで抽出して得られたものである。主成分はポリフェノールである」と記されている。既存添加物の多くは抽出物であり、複合成分の場合が多く、その品質管理のためには、明確な成分分析を行い、それを踏まえた規格作成が必要である。既存添加物名簿に記載されているブドウ果皮抽出物もそのような添加物の一つであり、その規格設定のためには含有成分分析を軸とした科学データの集積が求められる。本添加物の含有成分については詳細な情報が不足しており、その成分解析が

必要とされる。

そこで本研究では、ブドウ果皮抽出物製品中の含有成分を精査し、品質規格作成のための化学的データの集積を目的に検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試料および試薬

試料となるブドウ果皮抽出物は日本食品添加物協会を通じて入手した。分離、精製に使用したカラム充填剤は、Diaion HP-20, MCI GEL CHP20P (75–150  $\mu\text{m}$ ) (三菱化学), YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシイ), Develosil Spherical Porous Silica Lop ODS (野村化学) で、その他の試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。標品として用いた化合物は以下の通り [tryptamine (和光純薬), vanillic acid (東京化成), catechin (長良サイエンス), epicatechin (長良サイエンス), quercetin (和光純薬), quercetin 3-*O*-glucuronide (ユーカリ由来), myricetin 3-*O*-glucoside (ユーカリ由来), procyanidin B-1 (フナコシ), procyanidin B-2 (フナコシ), resveratrol (フナコシ), malvidin 3-glucoside chloride (フナコシ)]。

### 2. 装置及び測定条件

NMR : Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社) ( $^1\text{H-NMR}$  : 500 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  : 126 MHz) により、測定溶媒として methanol- $d_4$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) を使用し、ケミカルシフトはすべて TMS 基準のシフト値を  $\delta$  値で表示した。

高分解能 (HR) ESI-MS : microTOF-Q 質

量分析装置 (ブルカー・ダルトニクス社) でアセトニトリルまたはメタノールを溶媒として測定した。

UV : Shimadzu UVmini-1240 (島津製作所) を使用した。

逆相 HPLC (分析) : Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。[条件 1] カラム : Cosmosil 5C<sub>18</sub>-II (2.1 I.D.  $\times$  150 mm) (ナカライテスク製), カラム温度 : 40°C, 流速 : 0.3 mL/min, 測定波長 : 200–800 nm, 移動相 : (A) 水 (0.1%ギ酸含有) および (B) アセトニトリル (0.1%ギ酸含有) [濃度勾配条件 (B in A) : 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)]. [条件 2] カラム : L-column ODS (2.1 I.D.  $\times$  150 mm) (化学物質評価研究機構), カラム温度 : 40°C, 流速 : 0.3 mL/min, 測定波長 : 200–400 nm, 移動相 : (A) 5%酢酸および (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A) : 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)].

### 3. 試料の調製

ブドウ果皮抽出物 (212.1 g) に水 (3 L) を加えて攪拌し、水可溶部と不溶部に分けた。その可溶部を Diaion HP-20 ( $\phi$  5 cm  $\times$  33 cm) に負荷し、水 (5 L) で溶出後、10%~50%メタノール (各 3 L) で順次溶出し、最後にメタノール (3 L) で洗浄した。含水メタノールおよびメタノール溶出液についてはロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、真空乾

燥し、各溶出部とした。水溶出部については、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配し、各分画物を得た〔*n*-ヘキサン分画物 (5 mg)、酢酸エチル分画物 (10.3 g)、*n*-ブタノール分画物 (20.6 g)、水分画物 (53.7 g)〕。抽出、分画のフローチャートを図 1 に示す。

#### 4. 化合物の単離、精製

HPLC で明瞭なピークが観察された酢酸エチル分画物、*n*-ブタノール分画物に加え、Diaion HP-20 20%メタノール溶出部、メタノール溶出部について、各種カラムクロマトグラフィー (MCI GEL CHP20P, YMC GEL ODS-AQ および Develosil Spherical Porous Silica Lop ODS) による分離精製を繰り返し、酢酸エチルエキス (1 g) から epicatechin<sup>1)</sup> (10.2 mg), catechin<sup>2)</sup> (33.6 mg), myricetin 3-*O*-glucoside<sup>3)</sup> (4.8 mg), luteoliflavan<sup>4)</sup> (6.5 mg), procyanidin B-1<sup>2)</sup> (32.5 mg), procyanidin B-2<sup>5)</sup> (35.2 mg) を単離、同定した。

*n*-ブタノールエキス (1 g) からは, quercetin 3-*O*-glucuronide<sup>6)</sup> (15.6 mg), procyanidin B-5 or 8 (未同定) を単離した。Diaion HP-20 20%メタノール溶出部 (1 g) からは, syringic acid<sup>1)</sup> (10.2 mg), ethyl gallate<sup>1)</sup> (25.3 mg), vanillic acid<sup>1)</sup> (8.6 mg), tryptamine<sup>1)</sup> (2.0 mg) を、メタノール溶出部 (1 g) からは, quercetin<sup>7)</sup> (3.5 mg) を単離、同定した。化合物の同定は、文献値との比較または標品との機器分析データを直接比較することにより行った。

一方で、水分画物 (1 g) について MCI-gel CHP-20P カラムによる分離精製を行い、縮合型タンニンオリゴマー画分 (35 mg) と考えら

れる画分を得た。

### C. 研究結果

#### 1. 添加物製品の分析

ブドウ果皮抽出物製品を含水メタノールに溶解して HPLC 分析を行ったところ、図 2 (a) に示すクロマトグラムが得られた。これらピークを同定する目的で、製品の分画物を調製し、各エキスを得た (Diaion HP-20 各溶出部および *n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノール、水各分画物)。各エキスについても HPLC 分析し、図 1 (b~m) に示すクロマトグラムが得られた。製品溶液で検出されたピークを同定する目的で、まずは対応するピークが多く検出された酢酸エチル分画物について、成分の単離精製を試みた。酢酸エチル分画物を各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、6種の成分を単離、同定した。次いで、*n*-ブタノール分画物、Diaion HP-20 20%メタノールおよびメタノール溶出部について、同様にカラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、6種の化合物を単離、同定した。これらの他、プロシアニジンダイマー1種の存在を明らかにし、計 13 種を単離することができた。

化合物については、MS, NMR などの機器分析データに基づいた構造解析、または標品との直接比較により以下のように同定した (化合物 1-13)。

1. tryptamine
2. syringic acid
3. vanillic acid
4. ethyl gallate
5. catechin