

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24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

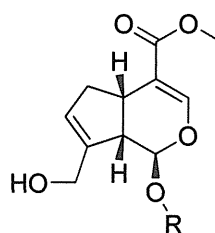
協力研究者 伊藤裕才 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨 既存添加物「クチナシ青色素」は、クチナシ果実中のイリドイド配糖体ゲニポシドをβ-グルコシダーゼでゲニピンとした後、タンパク質分解物のアミノ基と反応させることで得られる色素である。今回、通常アミノ酸19種および異常アミノ酸8種をゲニピンとモル比1:1で反応させ、生成した青色素について紫外可視部吸収スペクトルを測定し、さらにLC/MSで成分確認を行った。その結果、アミノ酸間で色素の形成に大きな差異がみられた。グリシンやβ-アラニン等の側鎖を持たないアミノ酸は高い色素形成を示した。一方、システインはほとんど色素形成を示さなかった。システインの反応液中には色素ではない反応物がLC/MS確認された。反応物をt単離精製し、NMRで構造解析した結果、システインのチオール基がゲニピンの1位に結合したチオエーテル構造であることが判明した。セリンについてもゲニピンの1位との間でエーテル構造をもつ反応物が単離・構造決定された。これらの結果から、求核性の高い官能基が側鎖にある場合、ゲニピンの1位を求核攻撃することで安定した化合物となり、青色素形成の連鎖反応が進行しないことが強く示唆された。

A. 研究目的

クチナシは、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(crocin)」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」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、β-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。¹⁾



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

「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β-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 β -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することで、青色素が生成される(Fig. 1)。青色素の形成メカニズムは解明されていないが、ゲニピンのヘミアセタールが、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に閉環し、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すると推定されている (Fig. 2)^{2) and 3)}。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。そのため、プロリンとは反応しない。重合反応は酸素の存在下で連鎖的に進行するため、色素の単離・構造決定は困難である。³⁾そのため、色素の化学構造についても不明な点が多い。これまでに、ゲニピンとグリシン(Gly)の混合物から得られた2量体(genipocyanin G1)だけが青色素の化学構造として報告されている (Fig. 3)。⁴⁾

「クチナシ青色素」において、添加する一級アミン源はタンパク質分解物に限られている。このタンパク質分解物の種類によって、「クチナシ青色素」の色調は差異が生じると製造会社から報告されている。これは、タンパク質分解物が、基原や分解方法によって様々な組成をもつためであるためであるが、さらには、生成する色素の色調が、ゲニピンとアミン以外の化学構造、たとえばアミノ酸であれば側鎖、に影響をうけることを示している。

昨年度(23年度)の研究では、タンパク質に含まれる20種のアミノ酸、および生体に含まれる異常アミノ酸類8種を加えたアミノ酸28

種(Fig. 4)をゲニピンと反応させ、生成する青色素について、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比較から、添加するアミノ酸によって色調に大きく差異が生じることを発見した。本年度は、その追加確認を行うと同時に、さらに各反応液中の成分をLC/MSで分析し、色素成分の確認、さらには色素形成反応が進行しないアミノ酸に対して、その原因を探ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 試薬

- ・ゲニピン(分子量 226.23, 和光純薬)
- ・L型通常アミノ酸類(19種, シグマアルドリッチ): アスパラギン酸(Asp), グルタミン酸(Glu), リシン(Lys), アルギニン(Arg), ヒスチジン(His), グリシン(Gly), アラニン(Ala), バリン(Val), ロイシン(Leu), イソロイシン(Ile), セリン(Ser), トレオニン(Thr), システイン(Cys), メチオニン(Met), アスパラギン(Asn), グルタミン(Gln), フェニルアラニン(Phe), チロシン(Tyr), トリプトファン(Trp)。
- ・異常アミノ酸類(8種, 和光純薬): β -アラニン(β Ala), γ -アミノ酪酸(GABA, γ -aminobutanoic acid), L-オルニチン(Orn), タウリン(Tau), DL-メチオニンスルホキシド(MetO), L-アミノアジピン酸(Aaa, 2-Amino adipic acid), アントラニル酸(Anta, antranilic acid), L-ホスホセリン(pSer, phosphoserine)。
- ・リン酸二水素ナトリウム(シグマ)
- ・リン酸水素二ナトリウム(和光純薬)
- ・ギ酸(シグマアルドリッチ)
- ・アセトニトリル 高速液体クロマトグラフィー用(関東化学)
- ・メタノール特級(和光純薬)

・水は MilliQ 水を用いた。

2. 装置

- ・紫外可視分光光度計(V-650, 日本分光)
- ・核磁気共鳴分析装置 (NMR) (JMN-ECA500 日本電子)
- ・固相カートリッジ : Sep-Pak C₁₈ Vac および Oasis MCX (Waters 社製)

3. 呈色反応

ゲニピンおよび 27 種のアミノ酸について、0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)を用いて、それぞれ 4mM 溶液 (20mL) を作製した。10mL ネジ付き試験管にゲニピン溶液および各アミノ酸水溶液を 2.5mL ずつ入れ、モル比 1 : 1 の混合液 5.0mL を作成した。混合液の入った試験管の蓋を閉めた後、70°Cの水浴中で 270 分間加熱して青色に発色させた。

4. 紫外可視吸収スペクトルの測定

各反応液の紫外可視部吸収スペクトルを、0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)を対象に測定した。測定には 20 倍希釈した検液を調製して行った。アミノ酸につき反応試験を 3 回繰り返し、測定を行った。

5. LC/MS 分析

各反応液を逆相 LC/MS 分析を行った。

HPLC 条件

- ・カラム : Cosmosil 5C₁₈-MS II (4.6 i.d. × 250 mm, ナカライテスク社製),
- ・カラム温度 : 40°C
- ・移動相 : A 水:ギ酸=1000:1(v/v)
B アセトリル:ギ酸=1000:1(v/v)
- ・勾配条件 : B 移動相 10%→100%(30min)
- ・流速 : 0.5mL/min
- ・試料注入量 : 10μL

- ・検出器 : フォトダイオードアレイ (PDA)
- ・測定波長 : 210~600nm 青色素検出の波長 580nm

ESI-MS 条件 : 正および負イオンモード

- ・キャピラリー電圧 : 3kV
- ・コーン電圧 : 10, 30, 60 V
- ・ソース温度 : 120°C
- ・脱溶媒温度 : 350°C
- ・脱溶媒ガス流量 : 400 L/h
- ・コーンガス流量 : 50 L/h

6. ゲニピンとシステインまたはセリンの反応生成物の構造解析

上記 3 の方法に従い、ゲニピンとシステインの 4 mM 反応液(50mL)を作成し、加温して呈色反応を進行させた。反応させた混合液はそのまま凍結乾燥に付した。乾燥した反応生成物を水で再溶解した後、メタノールおよび水で安定させた Sep-Pak C₁₈ カートリッジカラムに負荷した。水、30%メタノール、50%メタノール、メタノールで順に溶出した。それぞれの溶出液について前項で述べた条件で逆相 LC/MS 分析を行った。ゲニピンとシステインの反応物のピークが検出された 30%メタノール画分を分取した。この画分をメタノールと 30%メタノールで安定させた陽イオン交換型逆相系固相カートリッジ Oasis MCX に負荷し、30%メタノールおよびメタノールで順に溶出した。ピークが検出されたメタノール溶出液を分取し、減圧濃縮した後、凍結乾燥した。得られた無色のゲニピン/システイン反応生成物 (1) について、NMR 用重溶媒 (DMSO-*d*₆) に溶解して各種 NMR スペクトル分析 (¹H, ¹³C, COSY, ¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹³C HMBC) を行い、構造解析を行った。

ゲニピン/セリンの反応生成物 (2) も上記と同様の操作で単離精製し、構造解析を行った。

C. 結果および考察

昨年度、タンパク質を構成する 20 のアミノ酸に、異常アミノ酸類 (β Ala, Orn 等) 8 種を加えた 28 種を反応基質として呈色させ、アミノ酸の種類による発色の差異について検討した。本年度はそれら反応物の成分解析が目的だが、昨年追試験も兼ねて、作成した試料について紫外可視吸収スペクトルを分析した。2 級アミノ基をもつ Pro はゲニピンと反応しないため、本年度の研究では除外した。

市販試薬のゲニピンを用い、リン酸緩衝液中でゲニピンとアミノ酸をモル比 1 : 1 (4mM) の割合で混合し、70°C で加熱して呈色を行った。加熱時間は昨年度の研究から反応が飽和する時間の 270 分とした。各反応物について、紫外可視部吸収スペクトルを分析した。

各アミノ酸におけ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ものを Fig. 5 に示した。アミノ酸ごとの色素の呈色の差異について、昨年度とほぼ同様の結果が得られた。側鎖のない直鎖型のアミノ酸である β Ala, GABA, Tau および Gly の呈色は、側鎖があるアミノ酸に比べて強かった。また、分子内に 2 つの 1 級アミノ基を持つ Lys や Orn も高い発色を示した。側鎖に同様の構造を持つアミノ酸同士、例としてアミド構造の Asn と Gln, 酸をもつ Asp と Glu, そしてアミノ基を持つ Lys と Orn は、極大吸収波長および強度共に類似した結果を示した (Fig. 5 and 6)。このようにアミノ酸の側鎖構造が青色形成に影響を与えていることが再確認された。27 種のアミノ酸の中で、Cys の反応物の呈色が一番低かった。これも昨年度と同じ結果である。

得られた 27 種のアミノ酸の反応液を、C18 カラムを用いた逆相 LC/MS によって分析した。青色色素は 580nm で検出した。生成した青色色素は、添加したアミノ酸によって極性が大きく違うため、移動相組成の勾配は広く設定した。27 種のアミノ酸の反応液のクロマト図を Fig 7 に示した。全ての反応液試料において、青色色素はカラム上で分離しないブロードピークとして観測された。色素量の多い直鎖型のアミノ酸の反応液の色素のピーク面積は大きかった。特に Gly の反応液においては、ブロードピーク中に複数の鋭いピークが観測された Fig 8。そこでこれらのピーク (1~7) について、陰イオンモードの ESI-MS 分析によって分子関連イオンを得た Fig 9。その結果、ピーク 1 が m/z 756.3, ピーク 2 が m/z 742.1, ピーク 3 が m/z 756.1, ピーク 4 が m/z 491.2, ピーク 5 が m/z 505.2, ピーク 6 が m/z 477.2, ピーク 7 が m/z 491.2 に分子関連イオンピークが得られた。これらのイオンが、分子量 (M) に対する $[M-H]^-$ に相当した場合、ピーク 5 は既報の genipocyanin G1 (分子量 506, Fig 3) である可能性が高い。もしその場合、genipocyanin G1 はゲニピンに Gly が結合した構造の 2 量体であるため、得られた m/z 値からピーク 1,2,3 は 3 量体であることが推測された。またピーク 4,7 についてはピーク 5 よりも 14Da 小さいことから、 CH_2 が 1 つ少ない可能性が推測された。またピーク 6 は、28Da 小さいことから、 CH_2 が 2 つ少ない構造が推測された。ゲニピンとアミノ酸の反応から生成する青色色素については、genipocyanin G1 以外に報告がない。今回得られた LC/MS の結果から、ピーク 1-7 についてはカラムクロマトによって分離精製が可能と考えられた。

次に色素形成が著しく低かったゲニピン/Cys の反応液について、ゲニピンと Cys が反

応していないのか、もしくは色素以外の反応物ができているのかを調査した。ゲニピン/Cysの反応液の210nmで検出したクロマト図を示した(Fig.10)。反応物中にゲニピンは殆ど残っておらず、替りに色素ではない新たな反応物の生成が確認された。観測されたピーク8,9,10の極大吸収波長は290nmであった。またLC/MS分析の結果、3成分(8,9,10)全てにおいて、正イオンモードで m/z 312に、陰イオンモードで m/z 310にイオンピークを観測した(Fig.11)。このことから、これら3成分の分子量は311と推定された。次に主要成分である8の単離精製を行った。ゲニピンとCysの反応液をC18の固相カートリッジに負荷し、水で洗浄した後、8を30%メタノールで溶出させた。30%メタノール画分は薄い茶褐色を呈してしたため、色素を除去するために、画分を陽イオン交換能をもつ逆相系固相カートリッジ Oasis-MCX に負荷した。8をメタノールで溶出させて乾燥した結果、白色の個体が得られた。

単離された8についてDMSO- d_6 を溶媒としてNMR分析した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルをFig.12に示した。ゲニピンのH-3のシングレットシグナル(δ_{H} 5.70)およびメチルエステルのシグナル(δ_{H} 3.55)が観測された。またCysの2位(α 位)と考えられる水素シグナル(δ_{H} 4.88)も観測された。 $^{13}\text{C-NMR}$ は14個の炭素シグナルを示した(Fig.13)。Cysのカルボン酸と考えられるシグナル(δ_{C} 172.5)が観測された。続いて2次元NMR(COSY, HMQC, HMBC)を観測した。COSYスペクトルはゲニピン中のH-1 \rightarrow H-9 \rightarrow H-5 \rightarrow H-6 \rightarrow H-7までのスピンスピン結合を観測した。またCysの2位と3位の結合も確認した。次にHMBCスペクトルを解析した結果、Cysの2位とゲニピンの3位との間で相関が観測された。またCysの2

位からゲニピンの1位への相関も観測された。これらのことから、Cysのアミノ基がゲニピンのヘミアセタール部位の酸素に置換したことが確認された。ゲニピンの構を決定に用いたHMBC相関をFig. 14に示した。興味深いことに、Cysの3位からゲニピンへの1位へのHMBC相関が確認された。これはCysのチオール基がゲニピンのC-1とチオエーテル構造を形成していることを示している。ゲニピンのC-1の化学シフト(δ_{C} 61.9)はチオエーテル結合の典型的な値を示しており、この構造解析を裏付けた。このように反応物8はゲニピンのヘミアセタールにCysのアミノ基が置換結合した後、さらにCysのチオール基がゲニピンのC-1とチオエーテルによる5員環構造であることが確認された。8の化学シフトをTable 1に示した。

ゲニピン/Serの反応液についてもCysと同様に、色素でない反応生成物が確認された(Fig. 15)。主要ピーク11はESI-MS分析の陰イオンモードで m/z 294、正イオンモードで m/z 296にイオンピークを認めた(Fig. 16)。そのため分子量は295と推定された。一方ピーク12,13については陰および正イオンモードでそれぞれ、 m/z 312と m/z 314にピークを認めたことから、11にくらべて18Da大きい構造であると考えられた。反応生成物3についても1次元(Fig. 17 and 18)および2次元NMRを用いて構造解析した結果、8のCysの替りにSerのアミノ基がゲニピンのヘミアセタール部に結合し、C-1との間にチオエーテルではなくエーテル構造を形成していることが判明した。エーテル構造とチオエーテル構造の違いはゲニピンのC-1の化学シフトの差から明確に判断できる(Table 1)。

このようにゲニピンとCysまたはSerから得られる反応生成物は、アミノ酸のアミノ基

がゲニピンのヘミアセタール部に置換結合したのち、側鎖のチオールまたはエーテルがゲニピンの1位を求核攻撃して生成したと考えられる。ゲニピンは、ヘミアセタールがアミノ基で置換した後、複雑な電子の動きを伴って連鎖反動的に重合していくと考えられている。この電子の移動の際、近傍に求核性の高い官能基、たとえばチオール基や水酸基がある場合、それら官能基の求核攻撃によってチオエーテルやエーテルといった安定な構造となることで連鎖反応が停止し、色素形成が進行しないと推測される。これは Gly や β Ala のように側鎖を持たないアミノ酸ほど色素形成率が高かったという結果をよく説明している。

D. 結論

ゲニピンとアミノ酸の反応による青色色素の生成において、アミノ酸の側鎖が発色に大きく影響することを確認した。特に Gly や β Ala のような側鎖のないアミノ酸類は色素形成が高かった。ゲニピンと Gly から得られる青色色素は、逆相 LC/MS 上で複数の色素ピークを示し、分子量からゲニピン/Gly 複合体の3量体までが推測された。一方で、ゲニピン/Cys の発色は弱く、LC/MS 分析の結果、Cys のチオールがゲニピンの一位の結合したチオエーテル化合物が得られた。これは側鎖のチオール基が電子密度の低い1位に求核攻撃したためと推測された。同様のエーテル結合をもつ反応物がゲニピンと Ser の反応物からも得られた。今回の研究によって、求核性の高い官能基は、ゲニピンとアミノ酸の色素形成を阻害することが示された。色素濃度の高い青色色素を得るためには、求核性の低い1級アミノ基源を用いる必要があると考える。今後

はこの求核反応をさらに検証し、色素形成における連鎖反応のメカニズムを明らかにしたい。

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

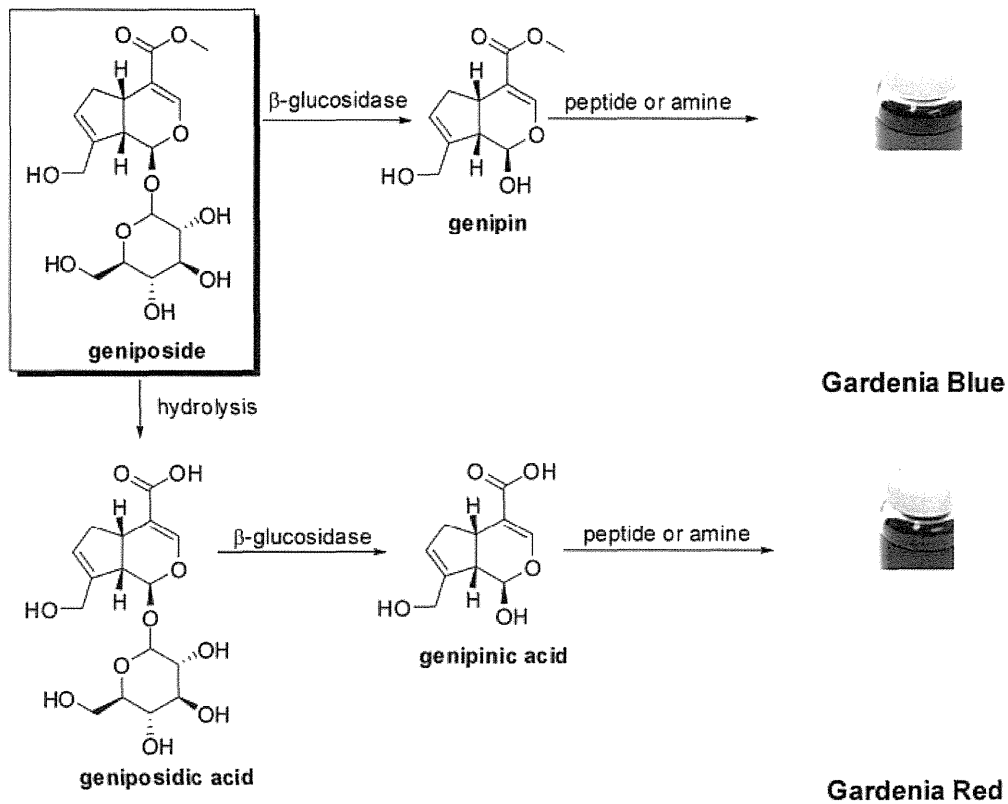


Fig. 1 Scheme of the formation from geniposide to two colorants; Gardenia Blue (クチナシ青色素) or Gardenia Red (クチナシ赤色素).

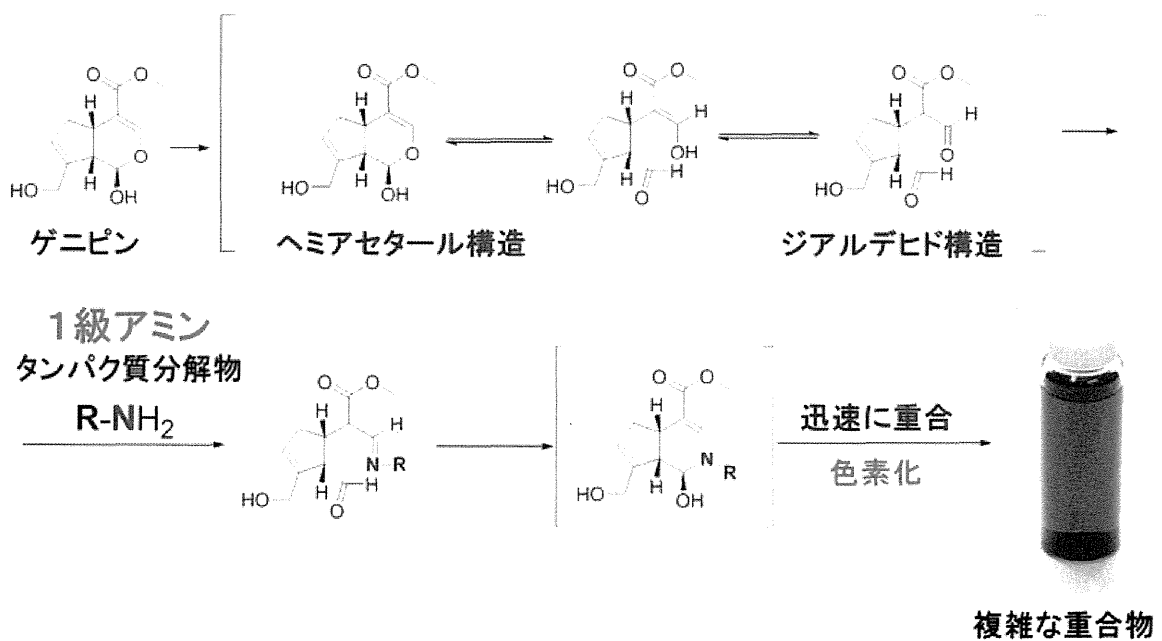


Fig. 2 Proposed reaction mechanism between genipin and a primary amine to produce blue pigments

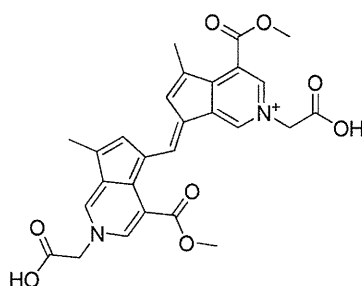


Fig. 3 Structure of genipocyanin G1, the blue pigment that was produced by the reaction between genipin and glycine (Gly)

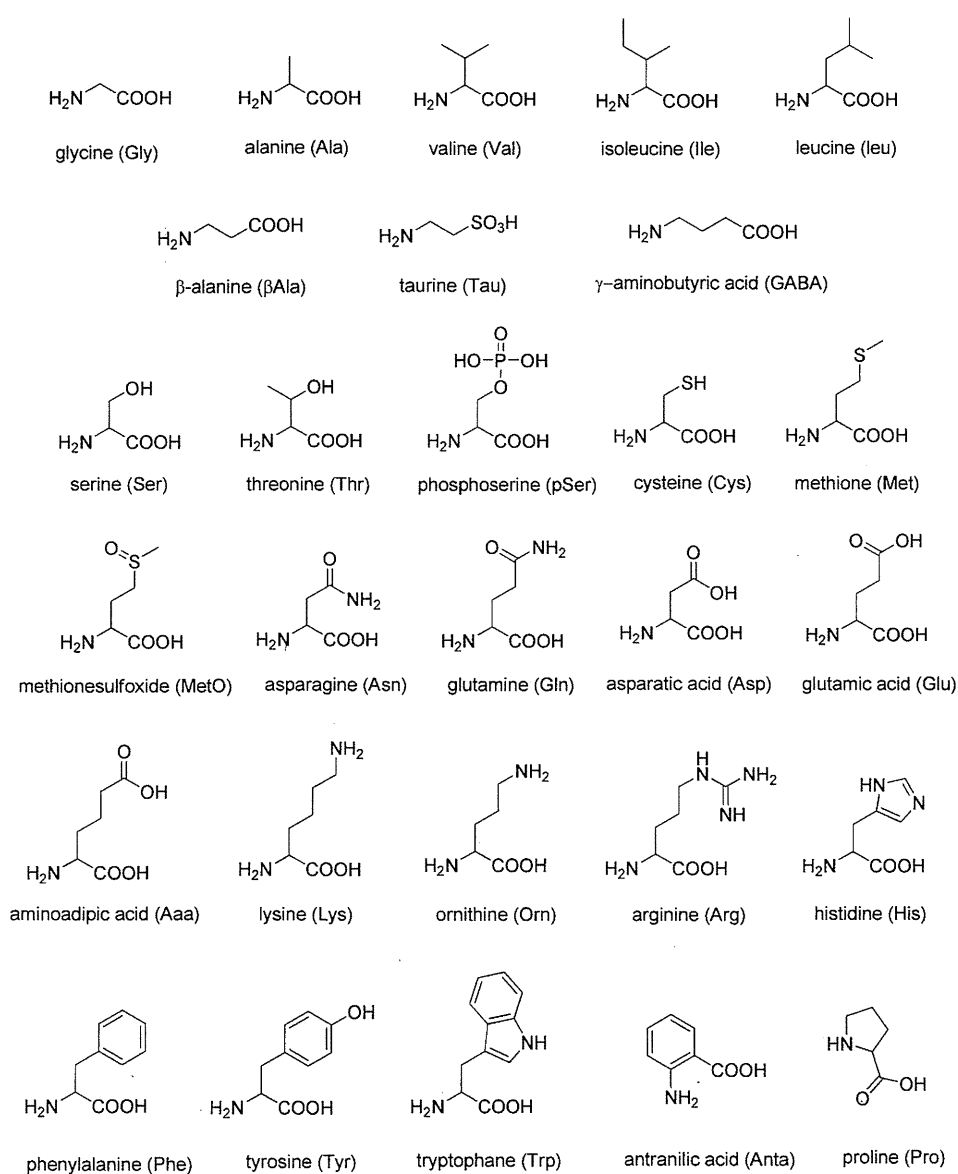


Fig. 4. Structures of 28 amino acids (20 usual and 8 unusual amino acids) provided for this study

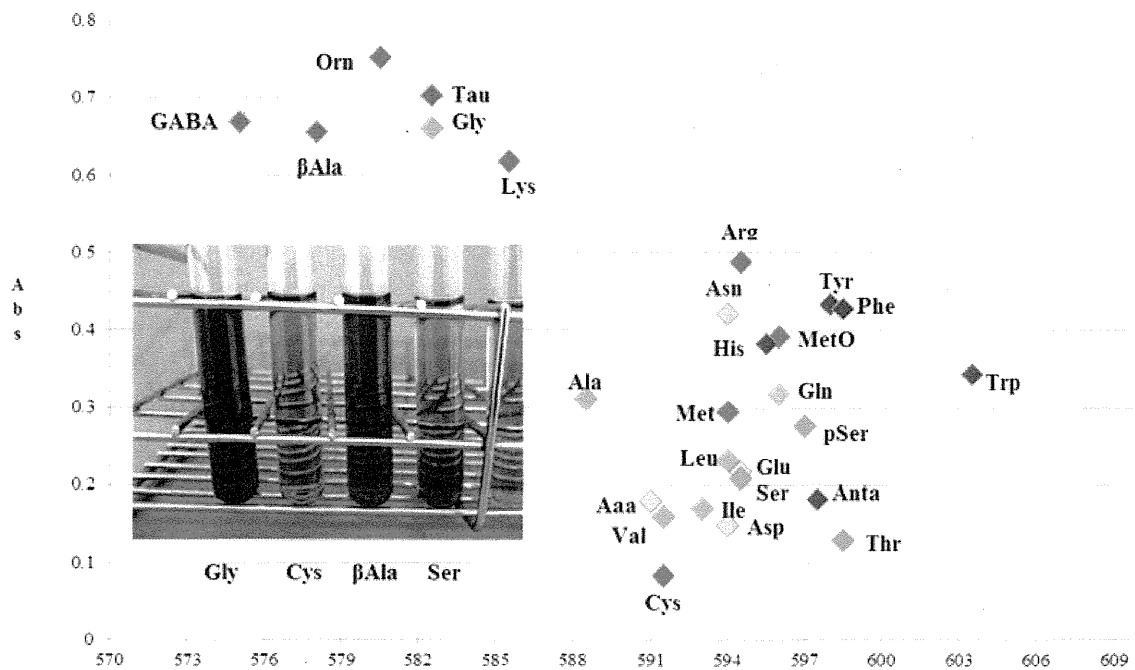


Fig. 5 ゲニピンとアミノ酸 27 種の反応生成物の極大吸収波長（横軸）とその吸光度

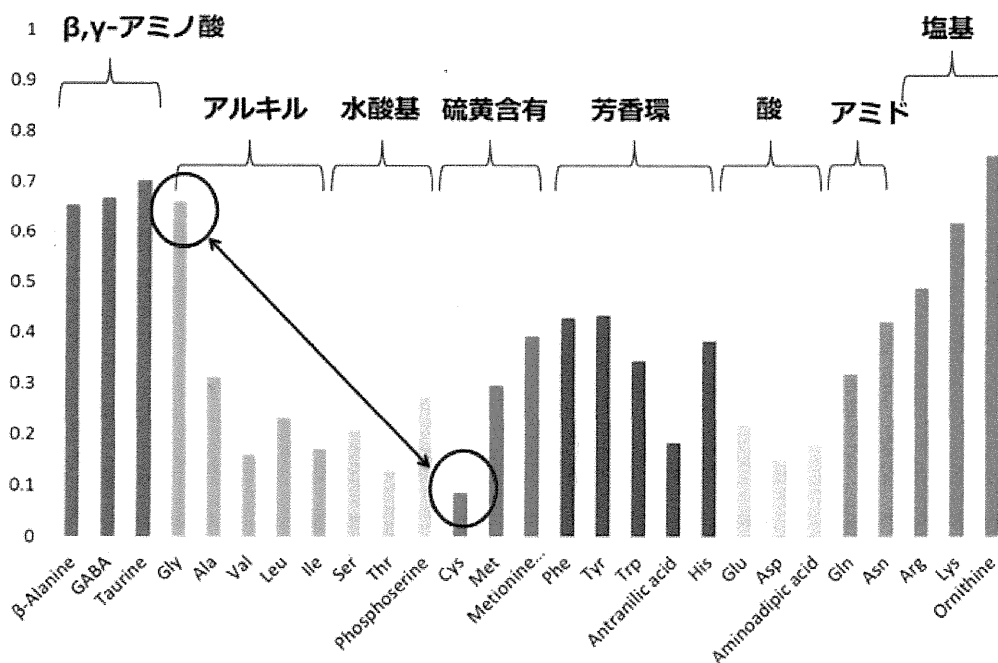


Fig. 6: ゲニピンとアミノ酸 27 種の反応生成物の極大吸収波長における吸光度の比較

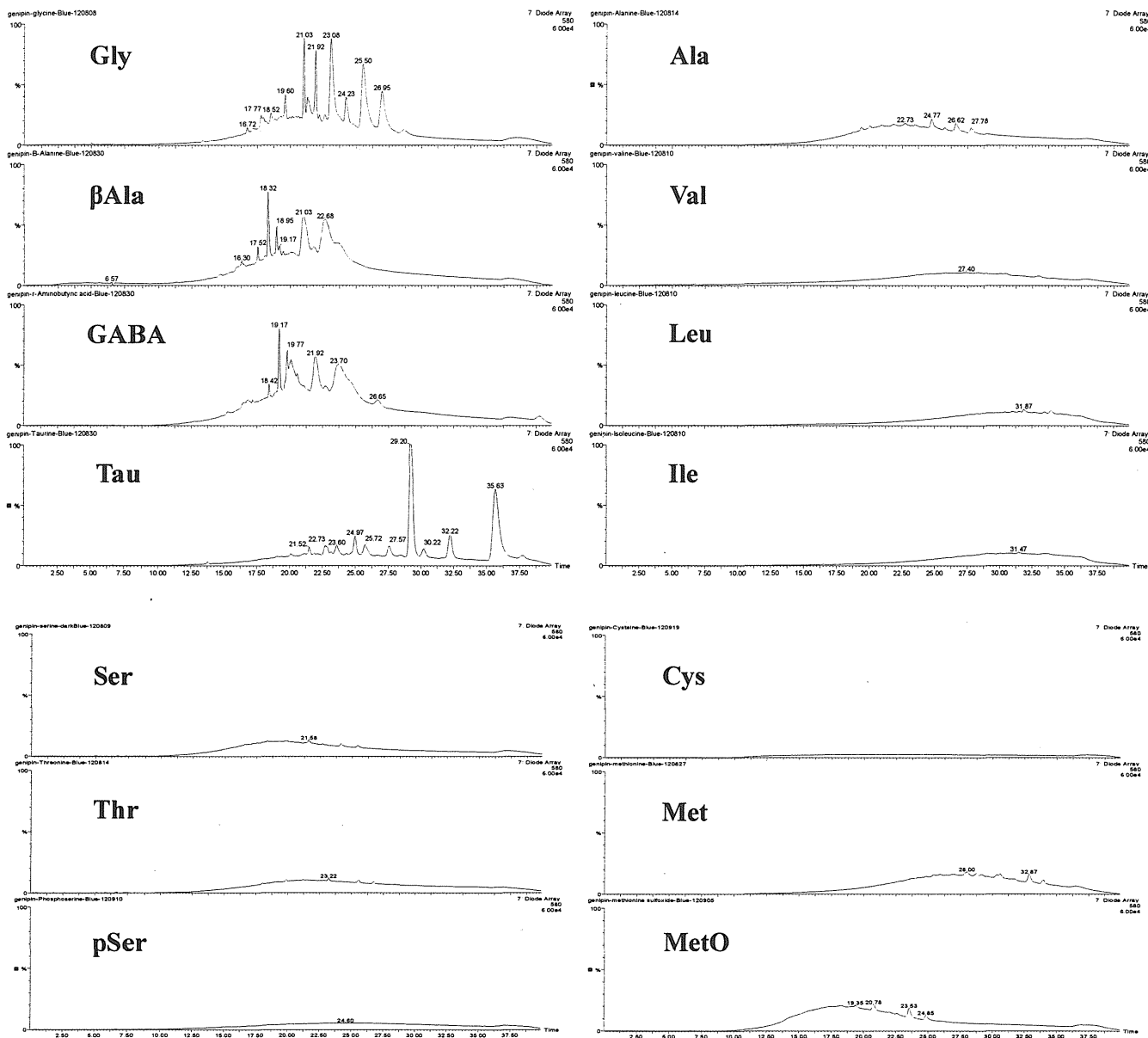


Fig. 7-1 ゲニピンとアミノ酸 27 種の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 580 nm)

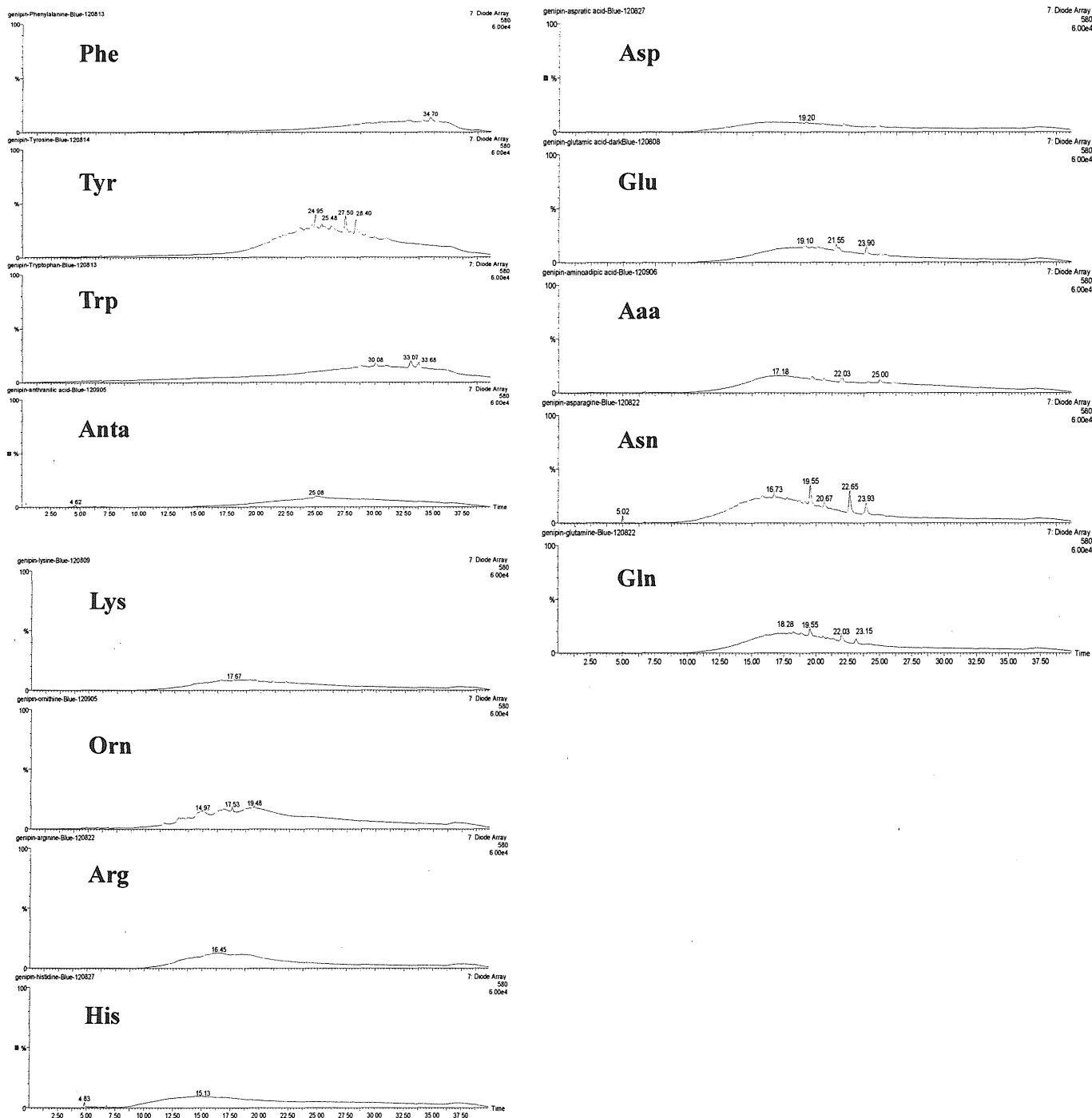


Fig. 7-2 ゲニピンとアミノ酸 27 種の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 580 nm)

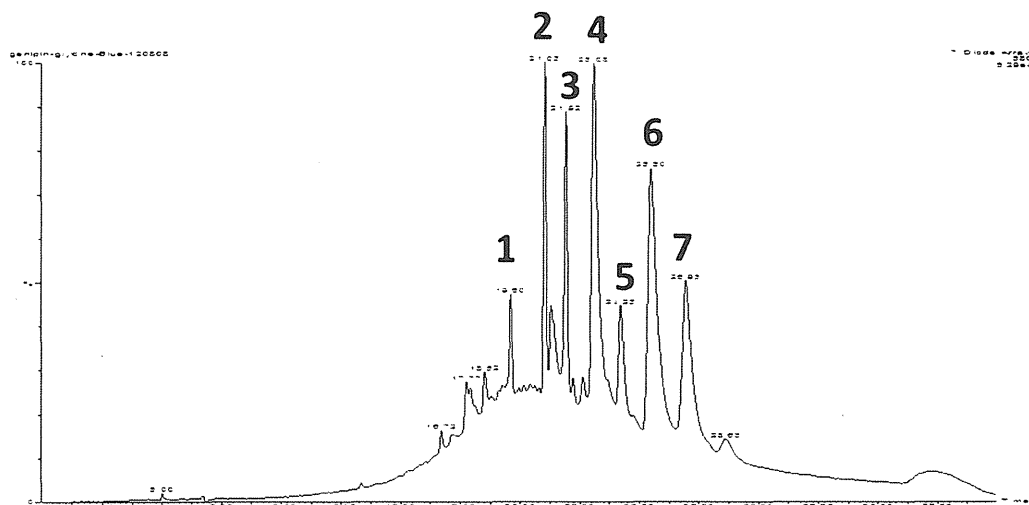


Fig. 8 ゲニピンと Gly の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 580 nm)

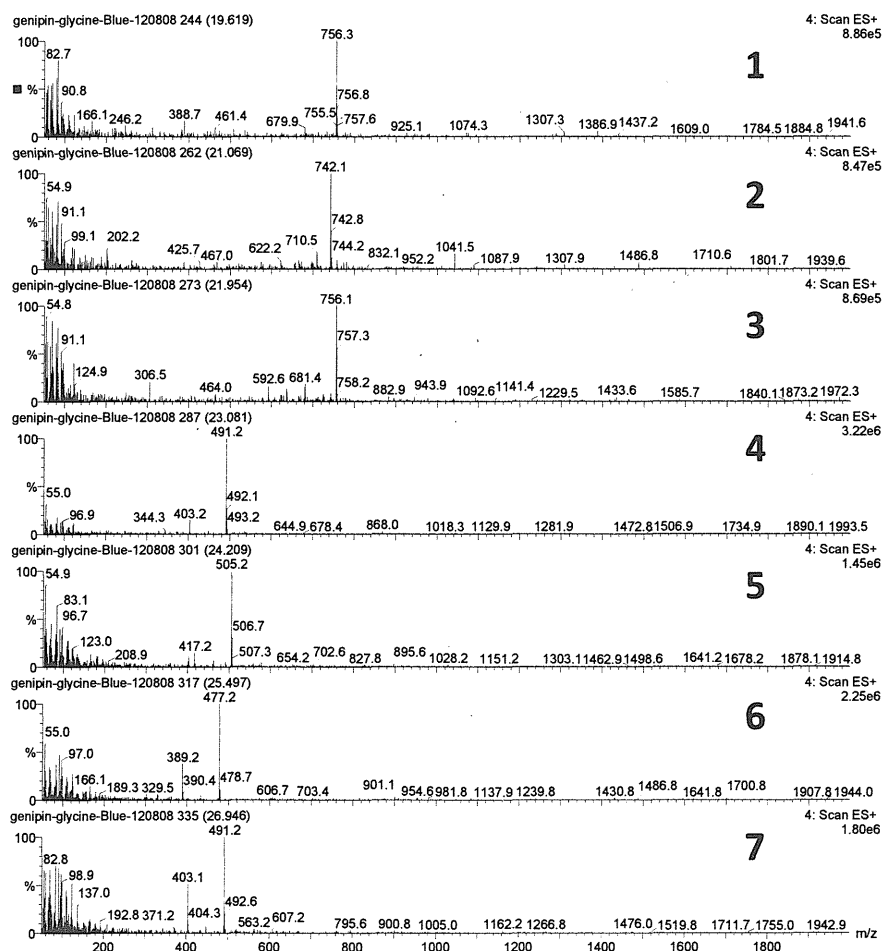


Fig. 9 Fig. 8 の各ピークにおける陰イオンモードの ESI-MS スペクトル

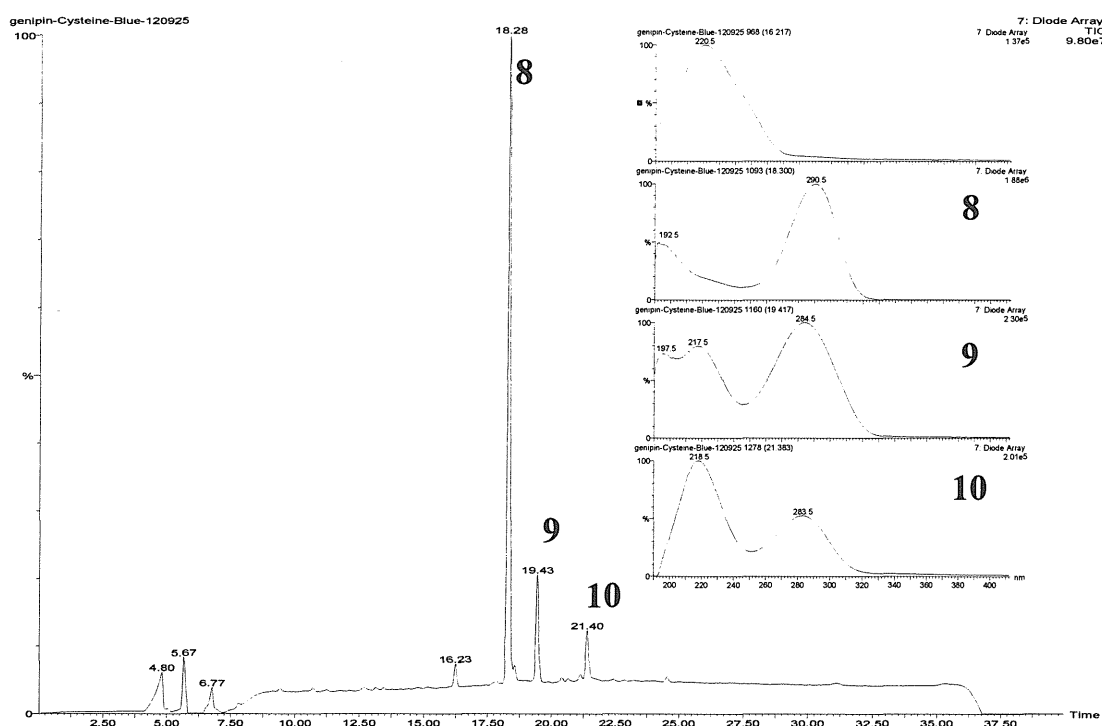


Fig. 10 ゲニピン/Cys の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 210 nm)

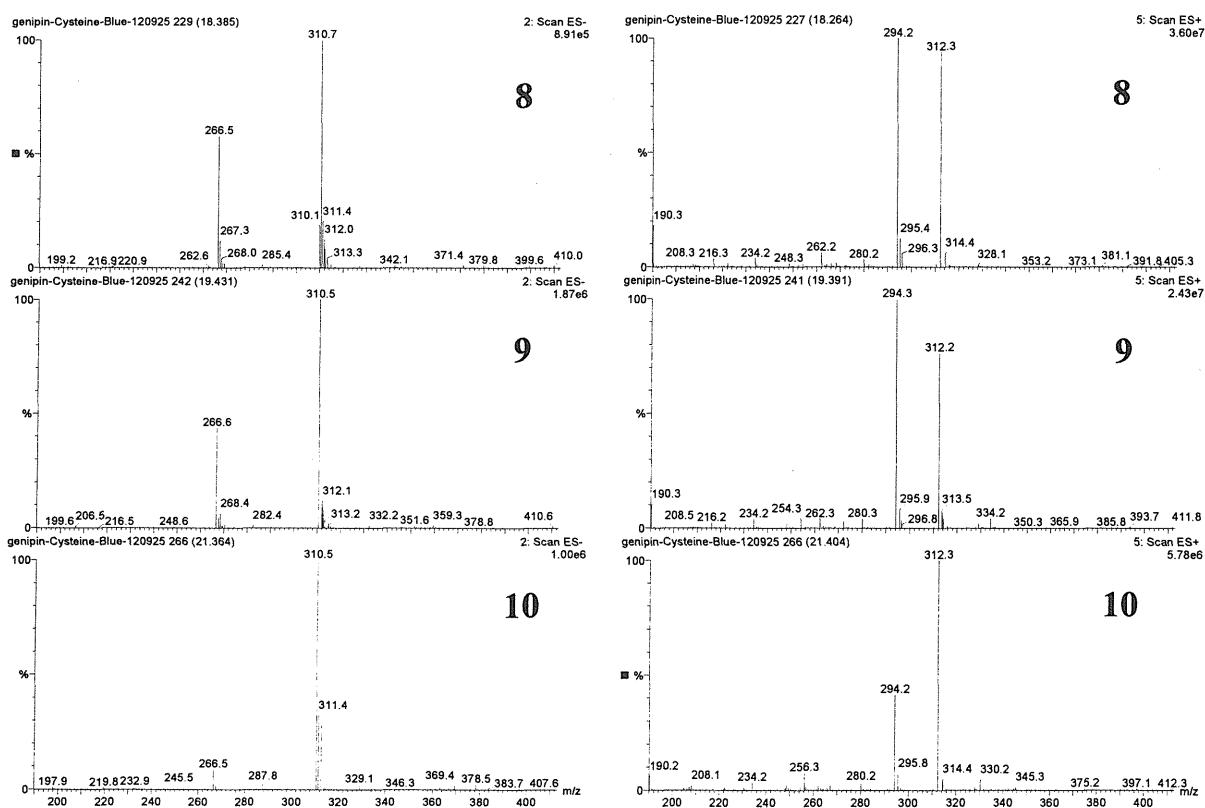


Fig. 11 Fig.10 における各ピークの陰イオン (左) および正イオン (右) ESI-MS スペクトル

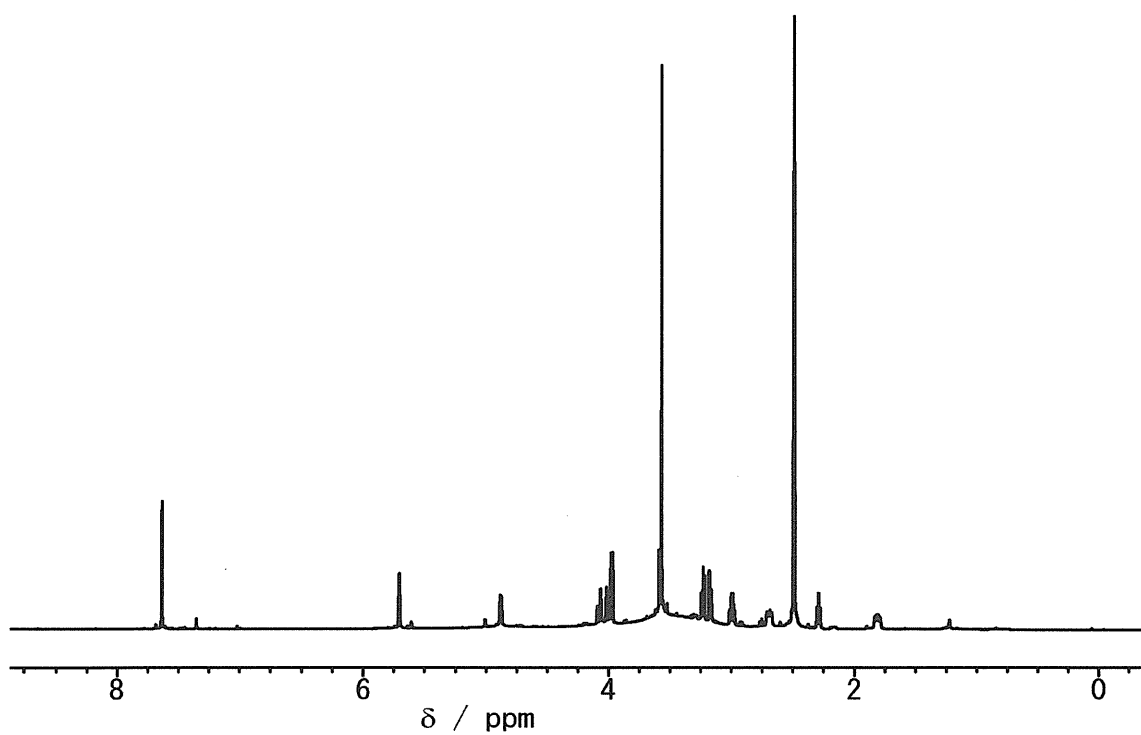


Fig. 12 ゲニピン/Cys から得られた反応生成物(8)の ^1H -NMR spectrum (DMSO- d_6)

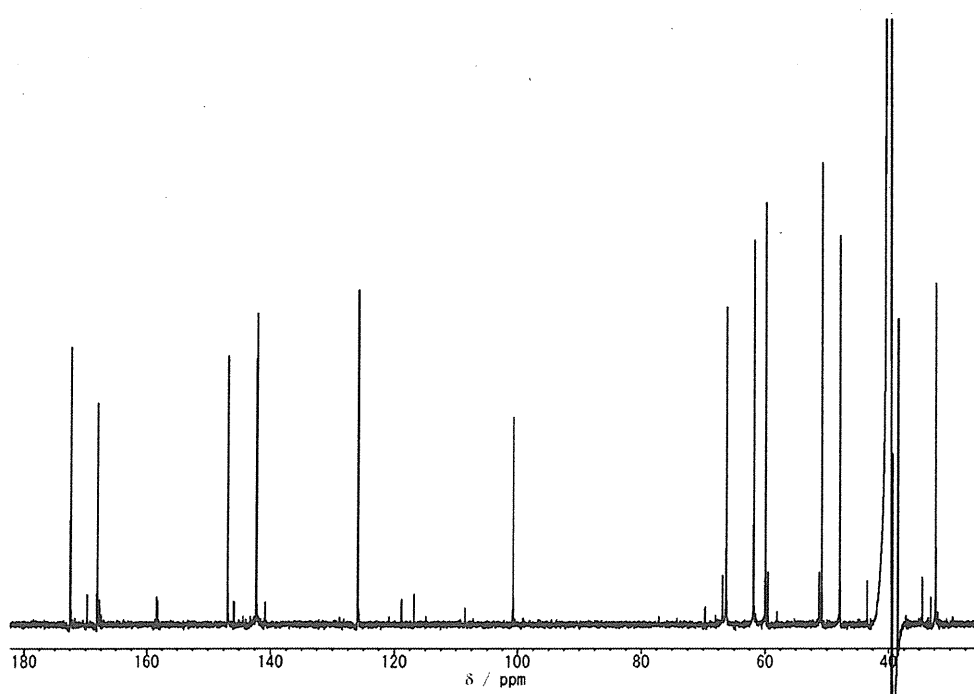


Fig. 13 ゲニピン/Cys から得られた反応生成物(8)の ^{13}C -NMR spectrum (DMSO- d_6)

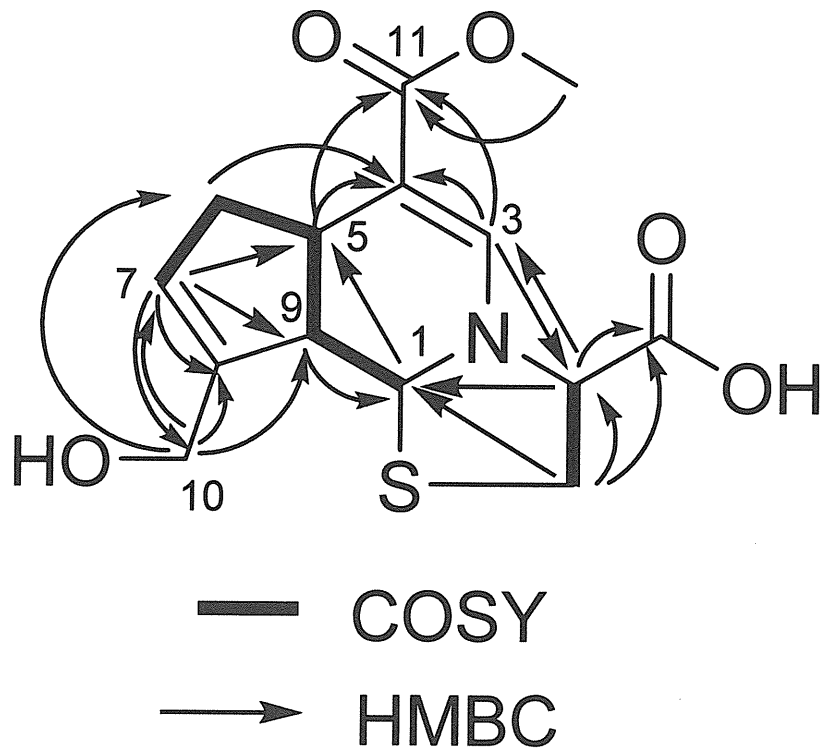


Fig. 14 ゲニピン/Cys から得られた反応生成物(8)の COSY 相関(太線)および HMBC 相関 (→)

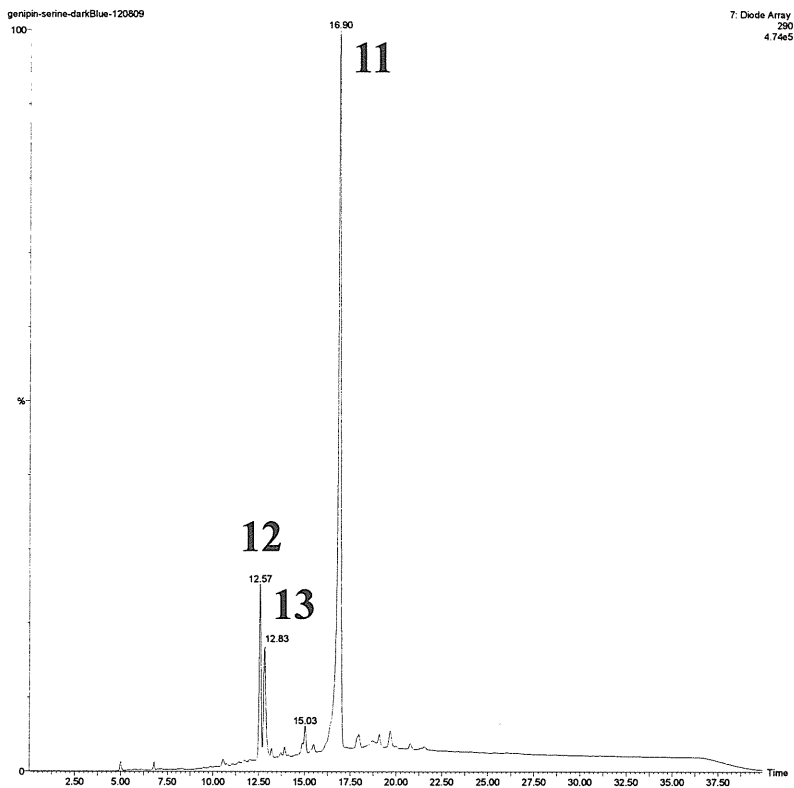


Fig. 15 ゲニピン/Serの反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 210 nm)

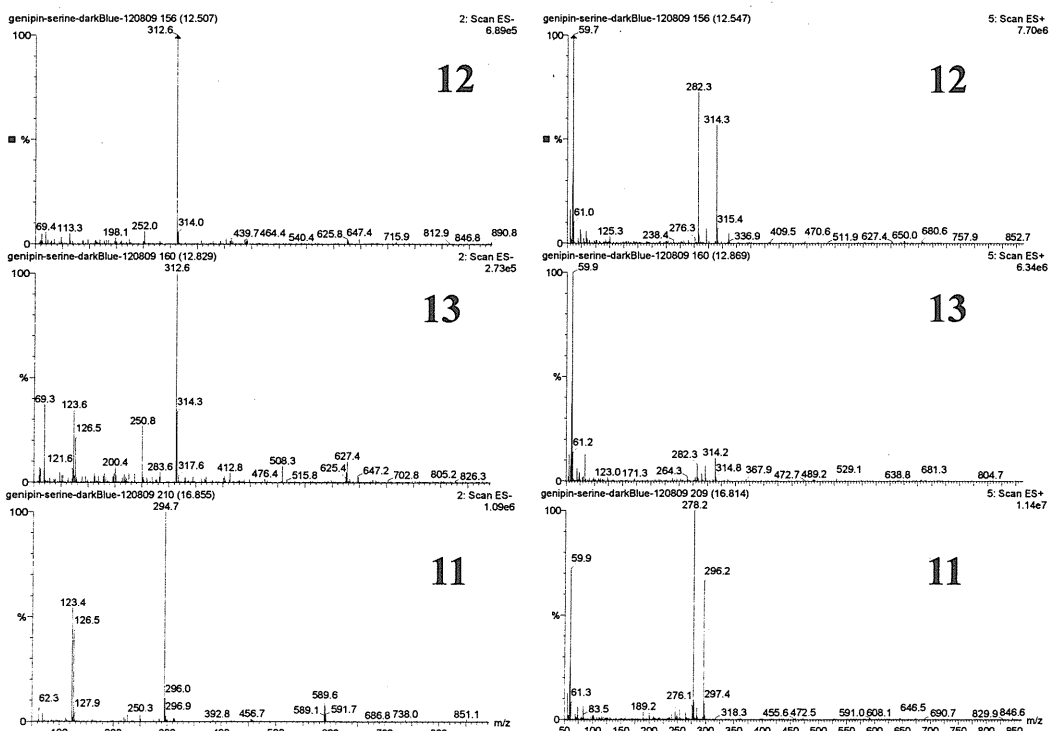


Fig. 16 Fig.15における各ピークの陰イオン (左) および正イオン (右) ESI-MS スペクトル

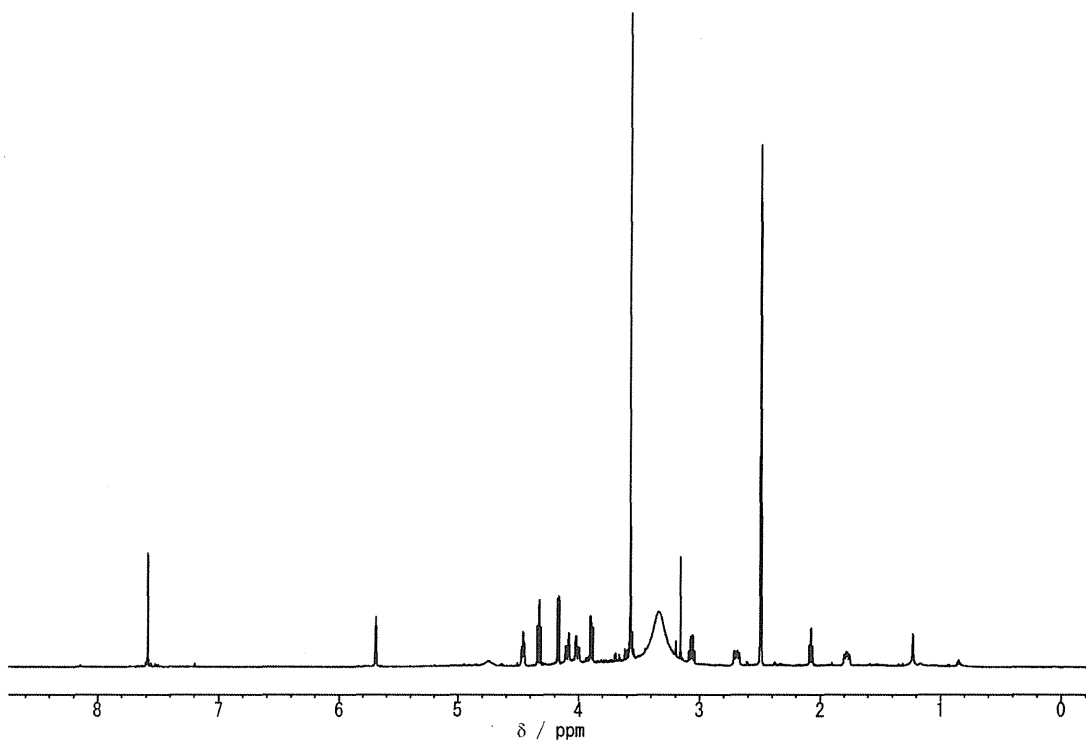


Fig. 17 ゲニピン/Ser から得られた反応生成物(11)の $^1\text{H-NMR}$ spectrum ($\text{DMSO-}d_6$)

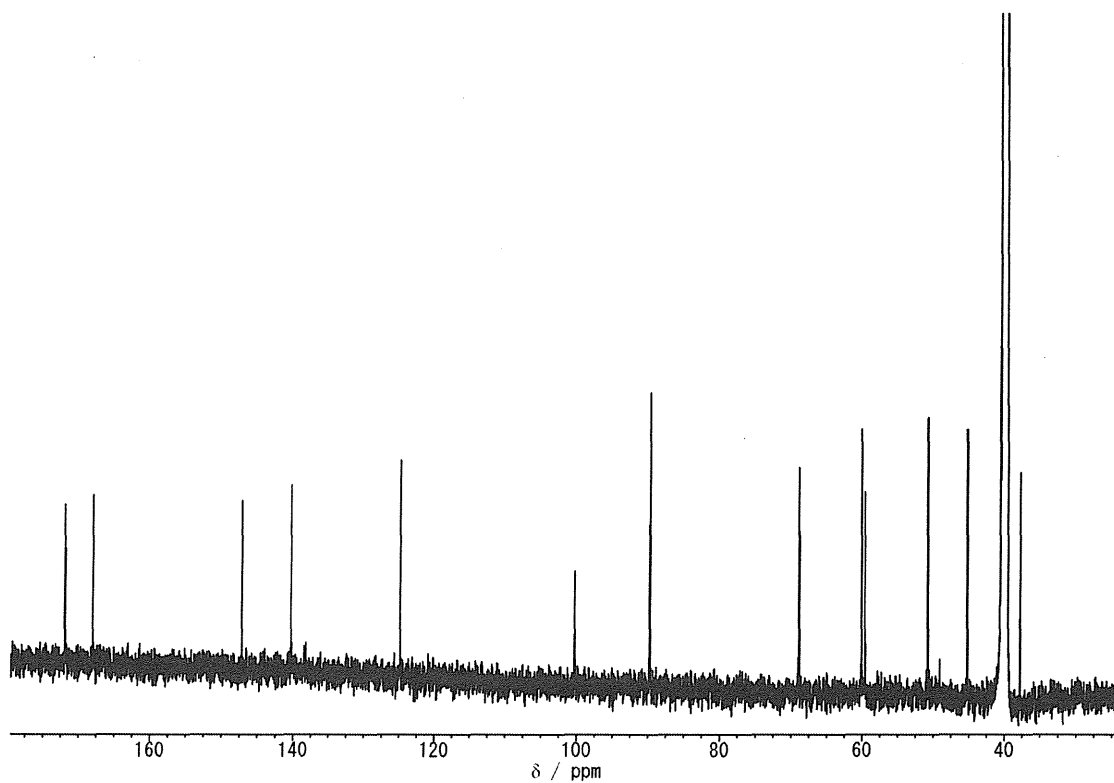
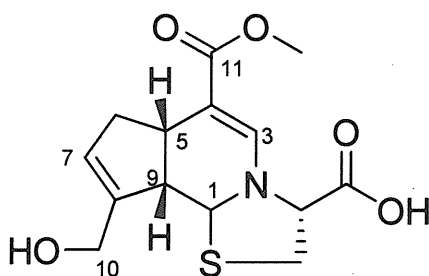


Fig. 18 ゲニピン/Ser から得られた反応生成物(11)の $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ($\text{DMSO-}d_6$)

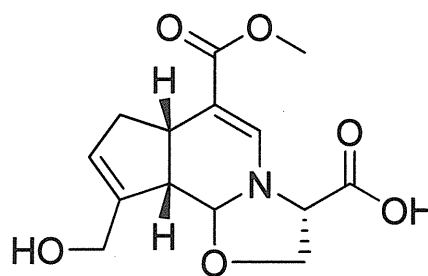
Table.1 Chemical shifts of reaction products (8) and (11)

position	Genipin/Cys (8)		Genipin/Ser (11)	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
Genipin				
1	3.96 (d, 10.3)	61.9	4.16 (d, 8.2)	89.7
3	7.64 (s)	142.3	7.59 (s)	140.3
4		100.8		100.2
5	2.99 (q, 9.0)	38.2	3.06 (q, 9.0)	37.9
6	1.81 (brt, 12.7)	39.0	1.78 (brt, 12.7)	39.0
	2.69 (dd, 15.8, 8.2)		2.69 (dd, 15.8, 8.2)	
7	5.70 (s)	126.0	5.69 (s)	124.9
8		146.9		147.2
9	2.29 (t, 8.9)	47.9	2.07 (t, 8.2)	45.2
10	4.05 (d, 14.4)	60.0	4.01 (d, 13.5)	60.1
	4.05 (d, 14.4)		4.08 (d, 13.5)	
11		168.1		168.0
12-Me	3.55 (s)	50.8	3.55 (s)	50.8
Cys, Ser				
1		172.5		172.0
2	4.88 (dd, 6.9, 2.7)	66.1	4.46 (t, 6.9)	59.6
3	3.18 (dd, 11.0, 2.7)	32.2	3.90 (dd, 8.2, 6.2)	68.9
	3.23 (dd, 11.0, 6.9)		4.33 (t, 8.2)	



8

Chemical Formula: C₁₄H₁₇NO₅
Exact Mass: 311.0827



11

Chemical Formula: C₁₄H₁₇NO₆
Exact Mass: 295.1056

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 24 年度分担研究報告書

既存添加物ブドウ果皮抽出物の品質評価法の検討

分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 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検討として、本年度は、23 年度の結果から明らかとなっている縮合型タンニン（プロアントシアニジン）オリゴマー画分について、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）による平均分子量を求めた。その結果、数平均分子量は 5999.6、重量平均分子量は 21287.7 であった。また、プロシアニジン系タンニンが多く含まれることから、ブドウ果皮抽出物製品中のプロアントシアニジンの簡便測定法について検討したところ、バニリン、硫酸を加えて呈色させ、吸光度測定することで測定可能であることが明らかとなった。この方法を適用し、catechin 換算で 2 製品を定量分析した結果、約 60%の含有率が算出され、測定可能であることが示唆された。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 助教

山上 沙織 松山大学薬学部 助手

A. 研究目的

既存添加物名簿記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。23 年度は、ブドウ果皮抽出物製品中の含有成分について検討し、ポリフ

ェノールを中心とした 13 種の化合物を単離、同定した。主ポリフェノールとして確認できたのは、catechin および epicatechin, さらに procyanidin B-1 および B-2 で, flavan 3-ol 類が主要成分であることが示唆された。また, HPLC 上で, 縮合型タンニン (プロアントシアニジン) オリゴマーに特徴的なブロードピークが観察され, この画分を単離することができた。

今年度は, これら結果を踏まえ, 縮合型タンニンオリゴマー画分について, ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 分析を行った。また, プロシアニジン系化合物の含有が多いことが示唆されたことから, ブドウ果皮抽出物中のプロアントシアニジン量の分析法について検討した。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

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。バニリンは和光純薬製, 硫酸はナカライテスク製を用いた。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。標品は, catechin (長良サイエンス) を用いた。柿皮抽出物は, 柿の皮を 70%アセトンで抽出し, 濃縮・乾燥したものをを用いた。

2. 装置及び測定条件

分光光度計は, Shimadzu UVmini-1240 (島津製作所) を使用した。逆相 HPLC (分析) は, Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラム: Cosmosil 5C₁₈-II (2.1 I.D. × 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%)].

3. GPC 分析

ブドウ果皮抽出物高分子量画分 (1 mg) (Fig. 1) を *N,N*-dimethylformamide (1 mL) に溶解させ, 以下の条件で分析を行った。カラム: TSK-gel Super AW3000 (6.0 I.D. × 150 mm), ポンプ: PU-2800 plus (JASCO), カラムオーブン: CO 631A (GL Sciences), カラム温度: 35°C, 流速: 0.3 mL/min, 検出: UV 280 nm, 移動相: *N,N*-dimethylformamide (+ 3M HCOONH₄ (0.5%)). また, 分子量標準試料として polystyrene standard (Shodex standard: SL-105, MW 580, 1310, 2970, 5030, 10700, 19900) を用いた。

4. プロアントシアニジン量分析

ブドウ果皮抽出物 (10 mg) にメタノール (1 mL) を加えて攪拌し, 1% (v/v) バニリン/メタノール溶液 (2 mL) および 25% (v/v) 硫酸/メタノール溶液 (2 mL) を加えた。10 分間超音波処理により攪拌後, メタノール (1 mL) を加え, 遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) し, 上清を試料溶液とした。試料溶液を分光光度計 (500 nm) で吸光度を測定した。(+)Catechin を 0.1, 1, 5, 10, 50 mg/mL にメタノールで調製し, 同様の処理を行い, 標準溶液とした。標準溶液の吸光度 (500 nm)