

別紙

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	村田義文	日本食品添加物協会
自主規格専門委員長、部会長・部会担当	伊藤秀行	理研ビタミン株式会社
規格専門委員長	斎藤知明	MCフードスペシャリティーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本正次	丸善製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島光一	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	西宮隆	株式会社タイショーテクノス
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	大本俊郎	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	橋本成久	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山田裕之	DSP五協フード&ケミカル株式会
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	増田哲也	エーザイフード・ケミカル株式会
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	尾崎史浩	株式会社ロツテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小川知成	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間保憲	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	香村正徳	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	廣田佳卓	花王株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	関谷史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	稲井隆之	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	阿部貴宏	三菱化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島敏貴	上野製薬株式会社
技術委員	大橋篤志	小川香料株式会社
技術委員	岡本隆広	エーザイフード・ケミカル株式会
技術委員	佐藤祐一	太陽化学株式会社
技術委員	義平邦周	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
技術顧問	山田隆	日本食品添加物協会
技術顧問	高橋仁一	日本食品添加物協会

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・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 23-25 年度 総括総合報告書

タマネギ色素の色素構造に関する研究
黄色タマネギ外皮由来の赤橙色色素の構造決定

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
分担研究者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部長

研究要旨 既存添加物「タマネギ色素」は、黄色タマネギの乾燥外皮から得られる橙色～褐色の色素である。これまでに乾燥外皮からは、xanthylum 構造をもつ cepaic acid だけが報告されているが、黄色の cepaic acid だけでは外皮の色調を説明できない。外皮から単離精製した赤橙色の新規色素は、cepaic acid のケトカルボン酸置換体であったが、最終的な構造決定には至らなかった。本研究では UPLC/Tof-MS を用いて新規色素の精密質量解析を行い、さらに置換基の重水素置換を試み、各種 NMR 分析を用いて構造決定を達成した。新規色素の構造は 4-ketocarboxylcepaic acid と判明した。

研究協力者

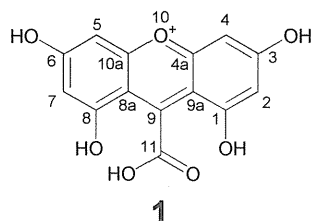
山崎 壮 実践女子大学生生活科学部生活
科学科 教授
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所
室長
多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

A. 研究目的

既存添加物「タマネギ色素」はタマネギの乾燥した鱗茎（外皮）をアルカリ水溶液または含水アルコールで抽出することで得られる橙色～褐色呈する着色料である。タマネギ色素は光や熱に対して安定であり、また pH の変化によって色調が変化しないことから食品の着色に多用されている。タマネギ色素の色素成分はクエルセチン(queracetin)であるといわれてきた。しかし、クエルセチンの極大吸収波長は 380nm 近辺であり、これはタマネギ色素の極大吸収（450～480nm）を説明できない。最近、我々はタマネギ外皮の水抽出物から色素成分を探索し、高極性画分から低分子量の黄色色素 cepaic acid(1)を単離し構造決定した。¹⁾これは黄色タマネギ外皮の色素成分として初めての報告となった。

黄色色素 cepaic acid (1) の構造は 9-carboxy-1,3,6,8-tetrahydroxyxanthylum であり、2 つのフロログルシノールがグ

リオキシル酸で架橋された後、フロログシノール間で脱水し閉環して生成すると考えられた。



実際に試験管内でフロログシノールとグリオキシル酸を混合した結果、1を含む橙色～褐色色素の生成が確認された。¹⁾フロログシノールはクエルセチンの酸化分解物であるため、1を含む黄色色素は、鱗茎が乾燥する際にクエルセチンが酸化分解し再構成されたものと推定されている。¹⁾

黄色タマネギ外皮の抽出液を逆相HPLC分析すると、色素成分は幅広いブロードピークとして観測される。そのため、高極性部にピークとして発見された1以外の色素成分については未解明である。また1の極大吸収波長は430nm(黄色)であり、赤橙色をしたタマネギ外皮の吸収スペクトルの全てを説明することはできない。そのため、1以外の色素成分についても構造決定を進める必要がある。今までの研究では、外皮の抽出液から赤橙色の新規色素2の単離精製に成功した。NMRによる構造解析の結果、2は1に α -ケトカルボン酸が置換した構造と推定されたが最終決定には至らなかった。

本研究では、UPLC/Tof-MSを用いて2の精密質量解析を行い、さらにNMR解析および化学分解等によってその全構造を解明したので報告する。

B. 研究方法

1. 試料

- ・市場で購入した黄色タマネギの外皮
- ・既存添加物「タマネギ色素」製造用

の外皮。三栄源・エフ・エフ・アイ株式会社より分譲を受けた。

2. 試薬

メタノール(特級, HPLC用特級), アセトニトリル(HPLC用特級), 酢酸エチル(特級)は和光純薬(株)から購入した。塩酸メタノールは東京化成(株)から購入した。塩酸(特級)およびトリフルオロ酢酸(TFA)は和光純薬(株)から、ギ酸(HCOOH; 特級 98%)はシグマアルドリッチジャパン(株)から購入した。無水硫酸ナトリウム(特級)は和光純薬(株)から購入した。水はMilliQ水を用いた。

3. 装置・器具

・UPLC/TOF-MS(飛行時間型液体クロマトグラフ質量分析装置)

UPLC system: Waters Acquity H-class

Tof-MS: Xevo-Tof G2MS

- ・NMR(日本電子(株)) ECA-600
- ・シリンジフィルター: GD/X シリンジフィルター(ワットマン(株)) PVDF membrane, 孔径 0.45 μ m, 25 μ m
- ・ミルサー: IFM-800DG(岩谷産業(株))
- ・濾紙: 分析用濾紙(直径 150mm): (東洋濾紙(株))

4. タマネギ外皮抽出液のUPLC/Tof-MS分析

市場で購入した黄色タマネギから乾燥外皮(2.2g)を採取し、ミルサーで粉砕した後、20%メタノール(100mL)を加えて90分間攪拌した。粗抽出液をブフナー漏斗で濾過し、さらにシリンジフィルターで濾過した。得られた抽出液を以下の条件でUPLC/Tof-MS分析に供した。

UPLC 条件

- ・ カラム : ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1 i.d. \times 50 mm, Waters 社製)
- ・ 移動相 : A) 0.1%ギ酸入り水, B) 0.1%ギ酸入りアセトニトリル
- ・ グラジエント条件 : B 移動相を 15 分間で 0%から 60%まで上昇させた。
- ・ 流量 : 0.3 mL/min
- ・ カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
- ・ 試料注入量 : 5.0 μ L
- ・ 紫外可視部検出器 : Photo diode array (PDA)による (検出範囲 190-600 nm), 黄色色素の検出波長 450nm

Tof-MS 条件

正イオンモード, キャピラリー電圧: 3.0 kV, コーン電圧: 30 V, ソース温度: 120 $^{\circ}$ C, 脱溶媒温度: 450 $^{\circ}$ C, 脱溶媒ガス流量: 800 L/h, コーンガス流量: 50 L/h

5. 新規色素(2)の単離精製

「タマネギ色素」用のタマネギ乾燥外皮 (60 g) をミルサーで粉碎し, 水 (2 L) を加えて 5 時間攪拌したのち, ブフナー漏斗を用いて濾過した。得られた抽出液に塩酸を加えて pH0.5 にしたのち, 酢酸エチルを加えて二層分配を行った。赤色色素を抽出した酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水して減圧で乾固した後, 酢酸エチルに再溶解し, 酢酸エチルで安定化させたシリカゲルカラムに負荷した。酢酸エチルで溶出したのち, 色素成分を酢酸エチル/メタノール (3:7) で溶出した。色素画分を減圧乾固した。残留物を 50%メタノールに溶解した後, 以下の 2 つ条件を用いて HPLC 分取を行った。

HPLC 条件①

カラム : Cosmosil Cholester (10 x 250 mm, nacalai tesque 製) : 移動相 A: 0.05%TFA 入り水. B: 0.05% TFA 入りアセトニトリル, グラジエント条件 : B 移動相 40-55% for 15 min, 流量 : 2ml/min, カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C, 検出 : 500nm

HPLC 条件②(最終精製)

カラム : Cosmosil 5PBB-R (4.6 x 250 mm, nacalai tesque 製) : 移動相 A: 0.05%TFA 入り水. B: 0.05% TFA 入りアセトニトリル, グラジエント条件 : B 移動相 30-37.5% for 15 min, 流量 : 1ml/min, カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C, 検出 : 500nm

色素 2 は酸性水溶液中で分解しやすいため, 分取したピークは水/酢酸エチルの 2 層の三角フラスコに分取した。酢酸エチル層 (色素粗画分) は無水硫酸ナトリウムによる脱水操作ののち減圧乾固した。最終的に色素 (2) を赤色固形物として 0.38 mg 得た。

6. 新規色素(2)の構造決定

新規色素 (2) を, DMSO- d_6 /TFA(9:1)を溶媒として, NMR 分析した。1 次元測定 (^1H , ^{13}C) および二次元測定 (^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC) を行った。

7. 新規色素(2)の重水素置換

新規色素 (2) を D_2O /DCI に溶解させ, 90 $^{\circ}$ C の水浴中で 4 時間加熱後, 1 部を LC/ESI-MS で分析した。凍結乾燥により溶媒を除去後, DMSO- d_6 :TFA- $d=9:1$ 溶媒に再度溶解させ, ^1H NMR スペクトルの測定を行った。

C. 結果および考察

新規色素(2)の精密質量の解析

市場で購入した新鮮な黄色タマネギの外皮を材料とし、その抽出液を精密質量が測定可能な UPLC/Tof-MS で分析を行った(Fig. 1)。その結果、高極性な 1 と共に中極性部に新規色素(2)が観測された。新規色素 2 は 485nm に極大吸収を示した(Fig. 2)。正イオンモードの ESI-MS 分析で m/z 361, 陰イオンモードで m/z 359 にピークを観測した(Fig. 3)。新規色素 2 の正イオンモード ESI/Tof-MS による精密質量分析を行ったところ、 $C_{16}H_9O_{10}$ (m/z 361.0196, Δ -1.1 mmu) と解析された。昨年度の研究から、2 は 1 の置換体であることが明らかになっているため、1 同様に正に帯電しており、正イオンモードの ESI-MS 分析では $(M)^+$ として観測されたと考えらえる。よって、2 の組成式は $C_{16}H_9O_{10}$ と決定された。1 の組成式との差は、炭素 2 分子および酸素 3 分子であった。これは、2 が 1 のケトカルボン酸置換体であるという昨年度の構造解析結果と一致した。

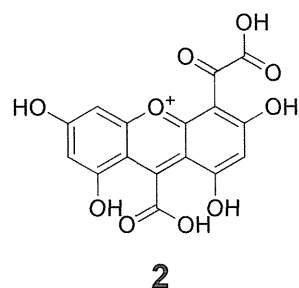
タマネギの外皮から新規色素(2)を単離精製した。精製した 2 について NMR 解析を行い、昨年解析した構造の再確認を行った。 1H -NMR スペクトル分析では、2 つのダブルットシグナルおよび 1 つのシングレットシグナルが観測された(Fig. 4)。 ^{13}C -NMR では 16 の炭素シグナルが観測された(Fig. 5)。これらの化学シフトは昨年度単離した 2 の化学シフトと一致した。各種 2 次元 NMR による解析を行った結果(Fig. 6)、色素 2 は 1 の α -ケトカルボン酸置換体であることが確認された。構造決定の鍵とあった HMBC 相関を Fig.

7 に示した。また化学シフトを Table 1 に示した。

新規色素 2 は、酸性水溶液中での加熱で容易にケトカルボン酸基が脱離し、1 に変換することが昨年度の研究で明らかになっている。そこで、重水素置換した溶媒中で脱離反応を起こした場合、置換位置が重水素で置換された 1-*d* が生成することが予想された (Fig. 8)。実際に重溶媒中 (D_2O/DCI) で 2 の加水分解を試みた結果、2 は完全に消失し、1-*d* に変換されていることが HPLC 分析で確認された (Fig. 9)。重水素置換型 cepaic acid(1-*d*) の分子量は 290^+ であるため、正イオンモードの ESI-MS 分析で m/z 290, そして負イオンモードで m/z 288 のイオンピークが観測されると予想された。しかしながら、LC/MS 分析の結果、正イオンモードで m/z 292, 291, 294, 負イオンモードで m/z 291, 290, 292 にイオンピークが観測された (Fig. 10)。これは水酸基も重水素置換したためと考えらえる。このためマススペクトルによる確認は断念した。

次に 1-*d* の 1H NMR スペクトルの測定を行った。1 同様に 2 つのシグナルが観測された。しかしながら、高磁場側のシグナル (δ_H 6.46) が、低磁場側のシグナル (δ_H 6.60) に比べて大きく検出された (Fig. 11)。2 つのシグナルの面積比は、ほぼ 2:1 であった。また δ_H 6.46 のシグナルはダブルットとシングレットが重なった形状に観測された。これらの結果から、低磁場側の水素 (δ_H 6.60) の 1 つが重水素で置換されていると判断された。すなわち、新規色素 2 の α -ケトカルボン酸は、cepaic acid (1) の δ_H 6.60 に相当する水素の位置に置換していることが判明した。

Cepaic acid (1)の構造決定が行われた際、2位と4位の化学シフトの帰属はなされなかった。しかしながら、1と同じ xanthylum 化合物およびクエルセチン等のフラボノイド類の化学シフトを調査した結果、水素シグナルにおいては、4位が低磁場に観測され、一方炭素シグナルにおいては2位が低磁場に観測されることが判明した (Table 2)。よって、1の化学シフトは、2,7位 (δ_H 6.63, δ_C 96.2)そして4,5位は (δ_H 6.46, δ_C 101.1)と帰属された。よって、2の α -ケトカルボン酸は1の4位に置換していると判断した。最終的に赤橙色の新規色素(2)の構造は 4-ketocarboxyl cepaic acid と決定された。



ケトカルボン酸が接続したフロログルシノール (2,4,6-trihydroxyphenylglyoxylic acid)は、クエルセチンの酸化分解物の1つとして報告されている。そのため、2も、外皮中の黄色色素が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。またタマネギ外皮の色素は、2のような cepaic acid の類縁体の集合体ではないかと推測された。

D. 総括

タマネギの乾燥外皮から、赤橙色の新規色素 2 を単離精製し構造決定した。精密質量解析および重水素置換体の NMR 分析の結果、新規色素は cepaic acid の4位にケトカルボン酸が置換した構造であると決定された。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

Ito Y., Ishizuki K., Sekiguchi W., Tada A., Akiyama T., Sato K., Yamazaki T., Akiyama H. The analysis of residual solvents in annatto extracts using a static headspace gas chromatography method. *Am. J. Anal. Chem.* 3, 638-645 (2012).

2. 学会発表 1件

- 1) 伊藤裕才, 坂本祐実, 杉本直樹, 穂山浩「赤タマネギ外皮に黄色色素は含まれているのか？」日本農芸化学 2013 大会 (仙台), 2013 年 3 月, 口頭発表

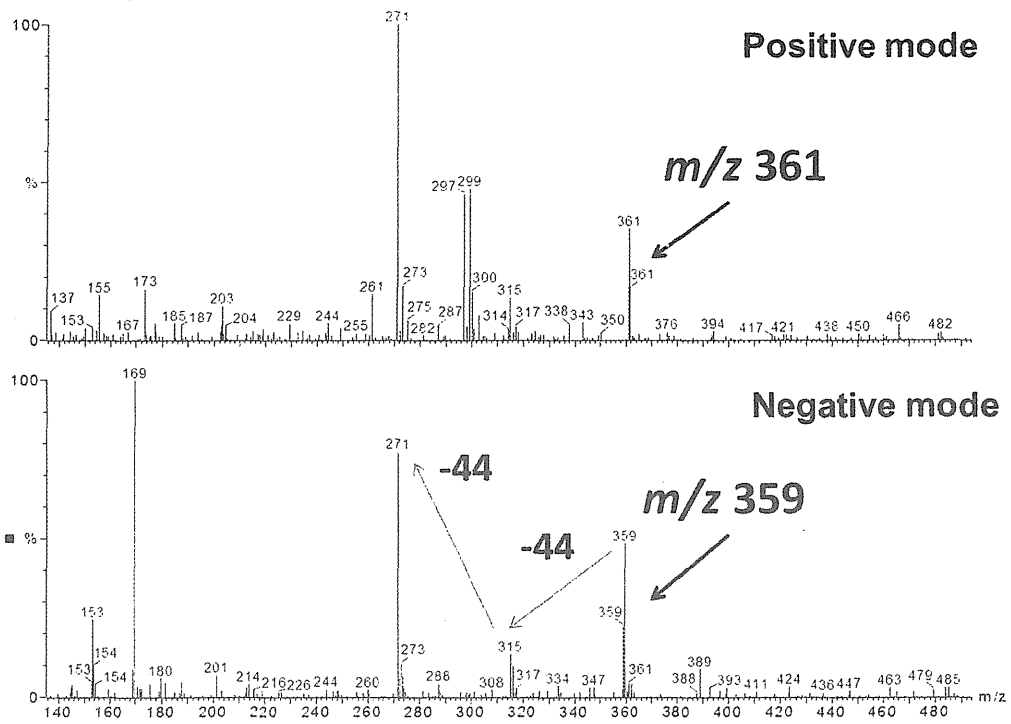


Fig. 3 新規色素(2)の ESI-MS スペクトル(上：正イオン，下：陰イオン)

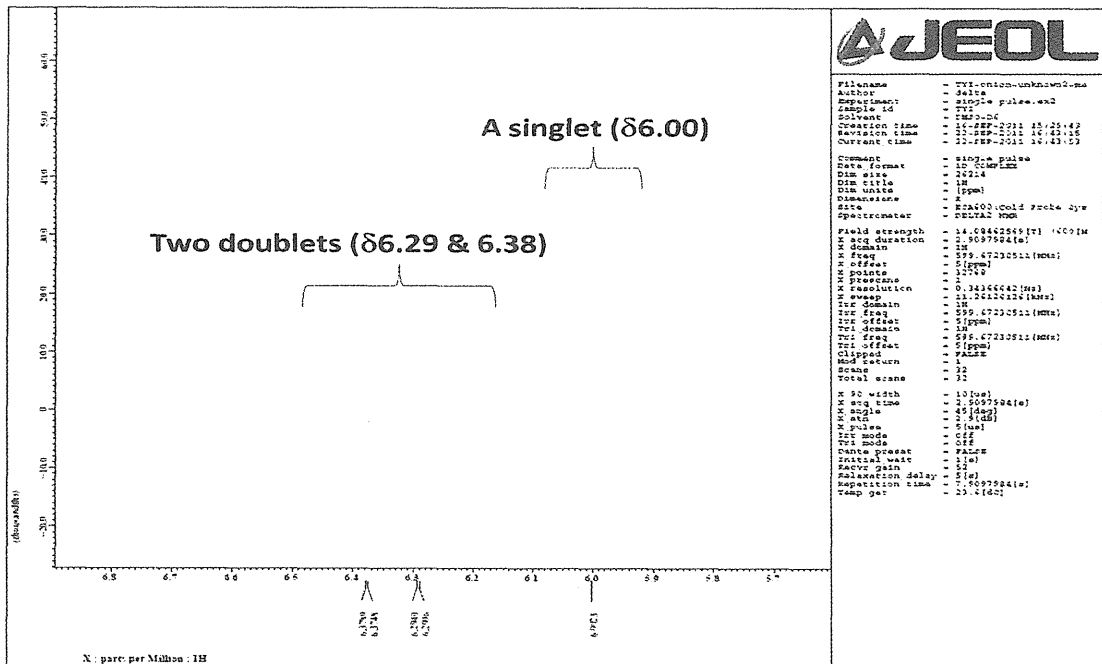


Fig. 4 新規色素(2)の ^1H -NMR スペクトル (DMSO- d_6 /TFA(9:1))

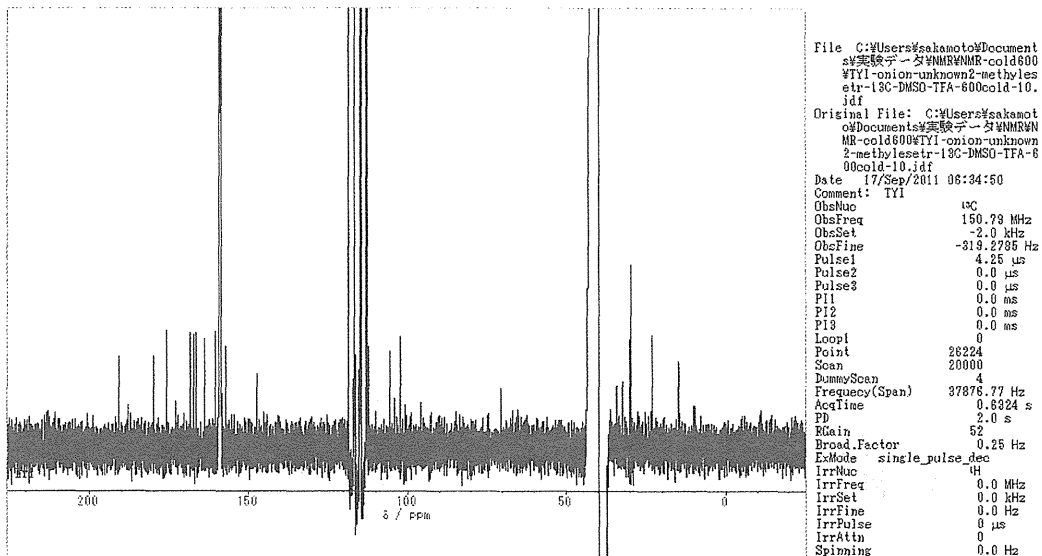


Fig. 5 新規色素(2)の ^{13}C NMR スペクトル (DMSO- d_6 /TFA(9:1))

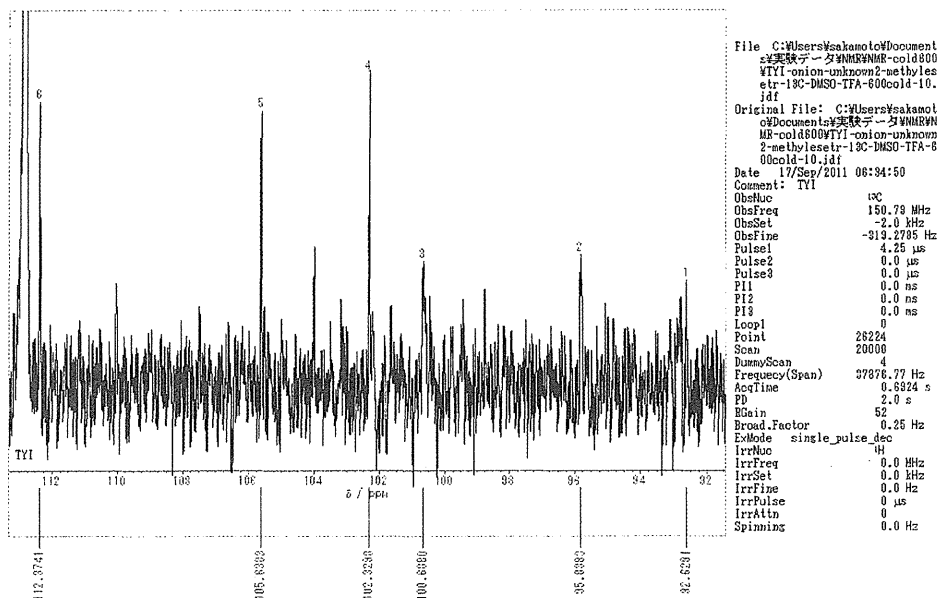


Fig. 5-a 新規色素(2)の ^{13}C NMR スペクトル(DMSO- d_6 /TFA(9:1))

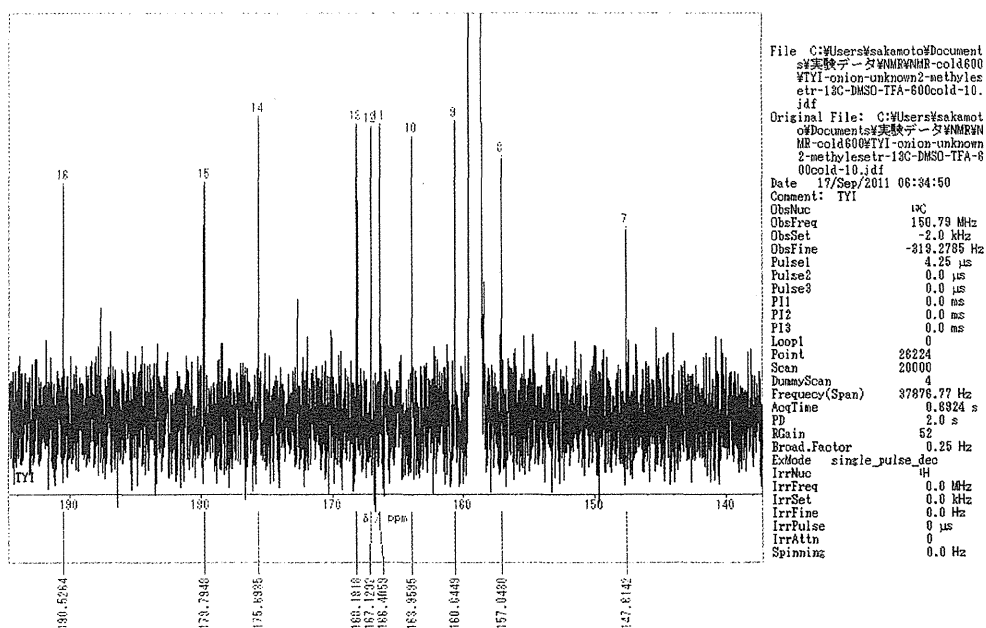


Fig. 5-b 新規色素(2)の ^{13}C NMR スペクトル(DMSO- d_6 /TFA(9:1))

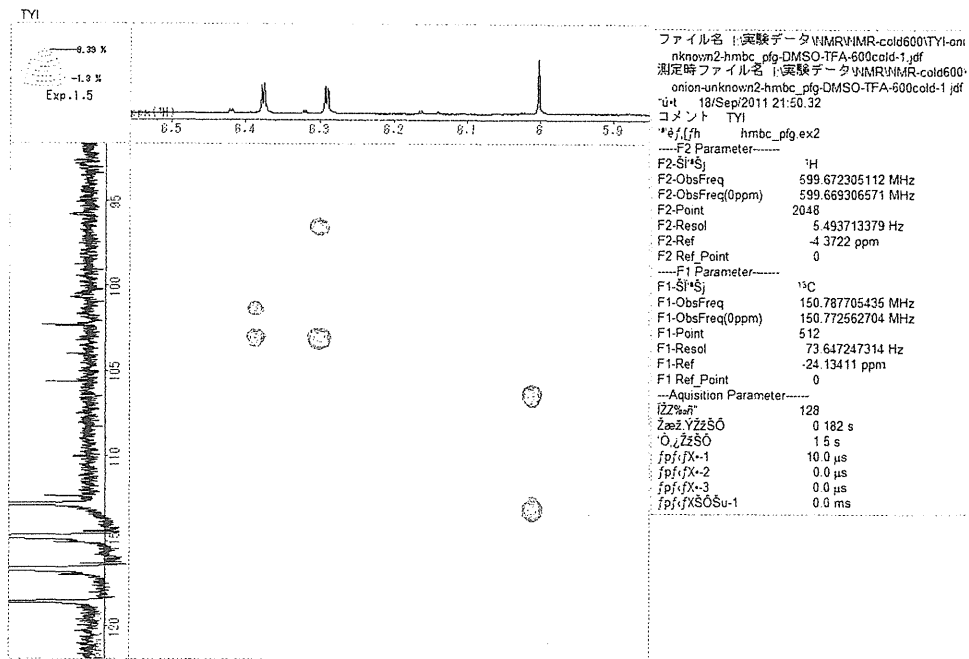


Fig. 6-a 新規色素(2)の HMBC スペクトル (DMSO-*d*₆/TFA(9:1))

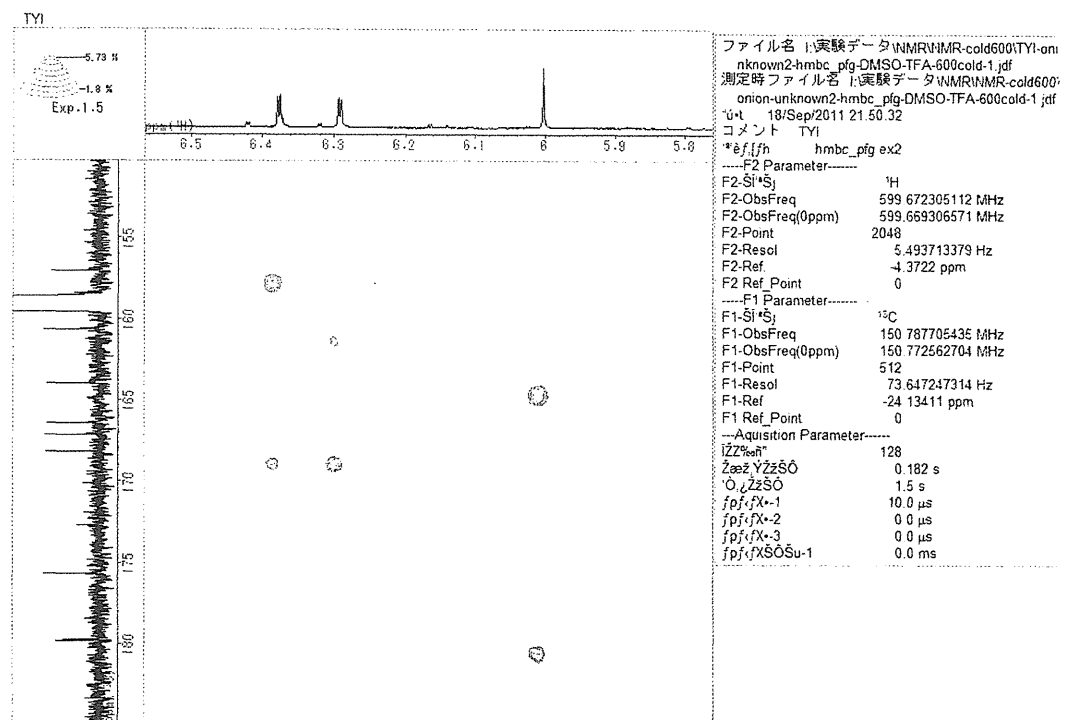


Fig. 6-b 新規色素(2)の HMBC スペクトル (DMSO-*d*₆/TFA(9:1))

Table 1. Chemical shifts of **2** in DMSO-*d*₆/TFA

position	δ_{H}	J (Hz)	δ_{C}	HMBC correlations
1			164.0	
2	6.00	s	92.6	C-1, C-2, C-3, C-4, C-9a
3			179.8	
4			105.6	
4a			175.7	
5	6.29	d, 2.2	100.7	C-5, C-6, C-7, C-8a, C-10a
6			168.2	
7	6.37	d, 2.3	95.8	C-5, C-6, C-7, C-8a, C-8a
8			157.0	
8a			102.3	
9			147.6	
9a			112.4	
10a			160.6	
11			166.4	
1'			190.5	
2'			167.1	

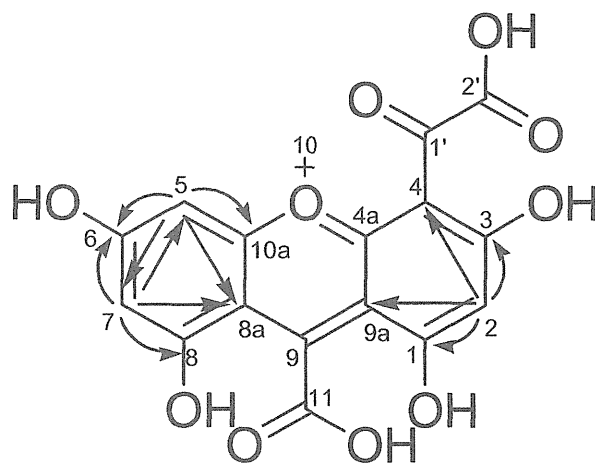


Fig. 7 新規色素 **2** の ^1H - ^{13}C HMBC 相関 (矢印)

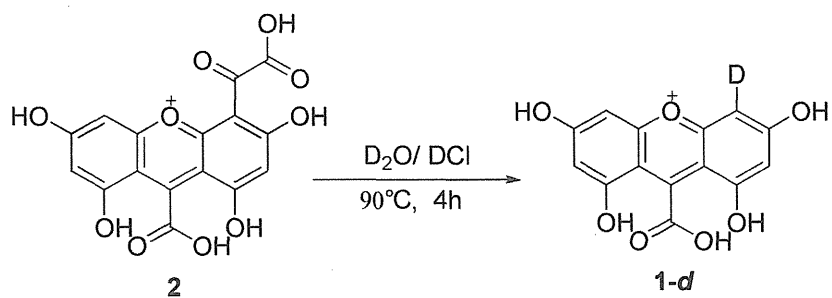


Fig. 8 新規色素(2)の重水素置換 cepaic acid (1-d)への返還

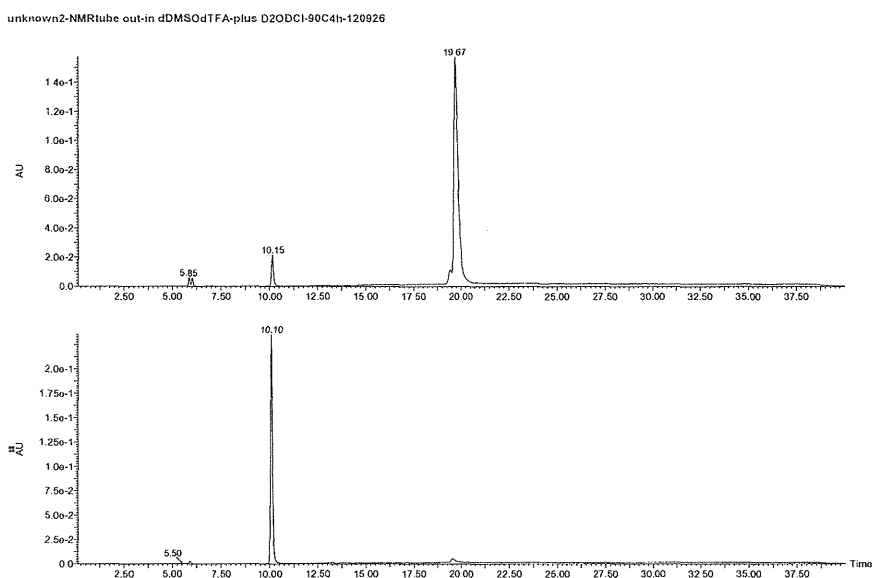


Fig. 9 HPLCによる新規色素(2:上)から1-d(下)への返還の確認(検出450nm)

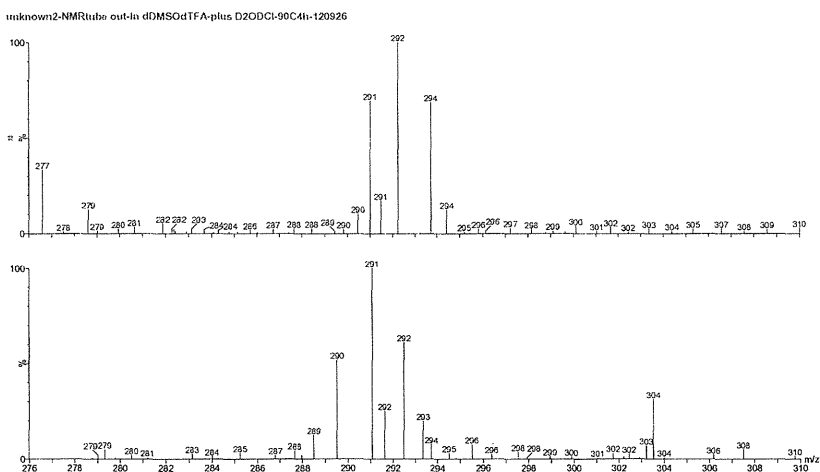


Fig. 10 1-dのESI-MSスペクトル(上:正イオン, 下:陰イオン)

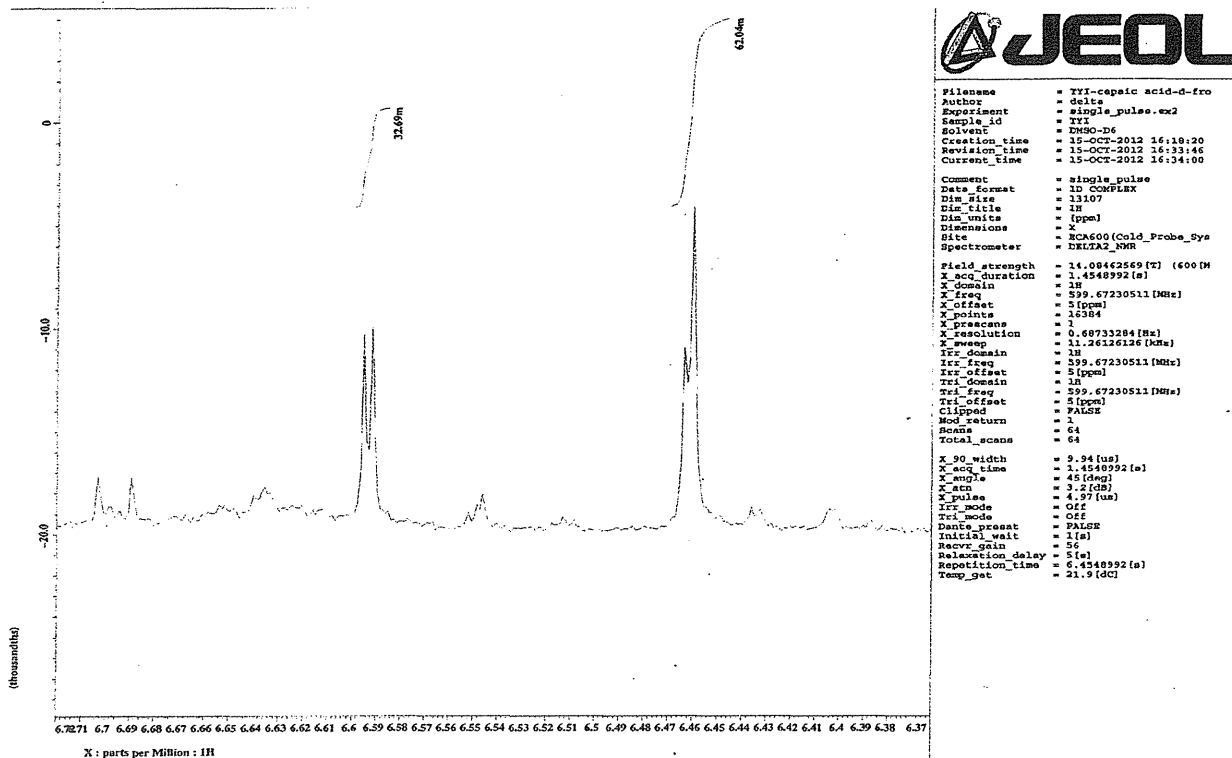


Fig. 11 重水素置換 cepaic acid (1-d)の ¹H-NMR スペクトル(DMSO-d₆/TFA(9:1))

Table 2: xanthylum 化合物およびフラボノイド, アントシアニンにおける 6,8 位の化学シフト

		position	
		6(4a)	8(6)
xanthylum salt (NJ4)	δ_{1H}	—	6.9
	δ_{13C}	107.9	95.6
quercetin	δ_{1H}	6.17	6.37
	δ_{13C}	99.3	94.4
cyanidin-3-glucoside	δ_{1H}	6.74	6.95
	δ_{13C}	102.5	94.2

* xanthylum salt の時のみ position は 4a と 6

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・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 23-25 度 総合分担研究報告書

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

分担研究者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部長

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ボシドを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。

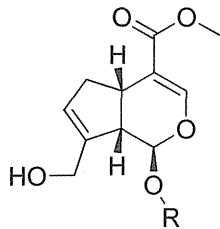
研究協力者

山崎 壮 実践女子大学生生活科学部食生活科学科 教授
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 室長
多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

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 (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」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「ゲニボシド (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。

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。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-Aminoadipic 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 アセトニトリル: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: 10 μ L
- ・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 , ^{13}C , COSY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C 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

タンパク質を構成する 20 のアミノ酸に、異常アミノ酸類 (βAla , 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。それら反応物の成分解析が目的だが、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。

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 βAla , 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 $[\text{M}-\text{H}]$ 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、CH₂ 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、CH₂ 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 290 nm 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。¹H-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。¹³C-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→H-9→H-5→H-6→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应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

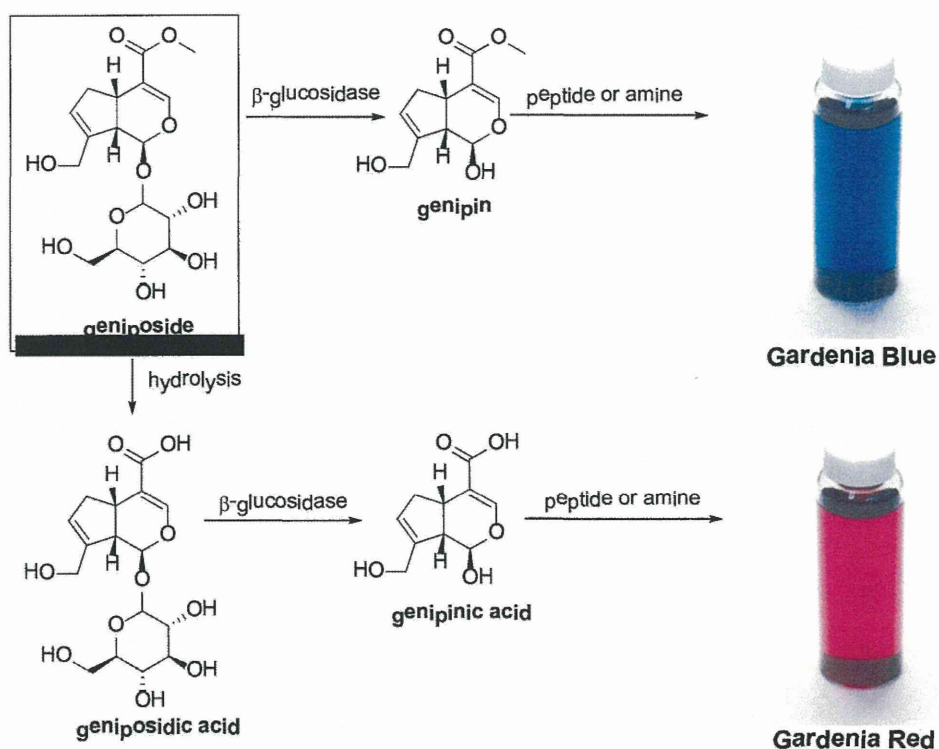


Fig. 1 Scheme of the formation from geniposide to two colorants; Gardenia Blue (クチナシ青色素) or Gardenia Red (クチナシ赤色素).

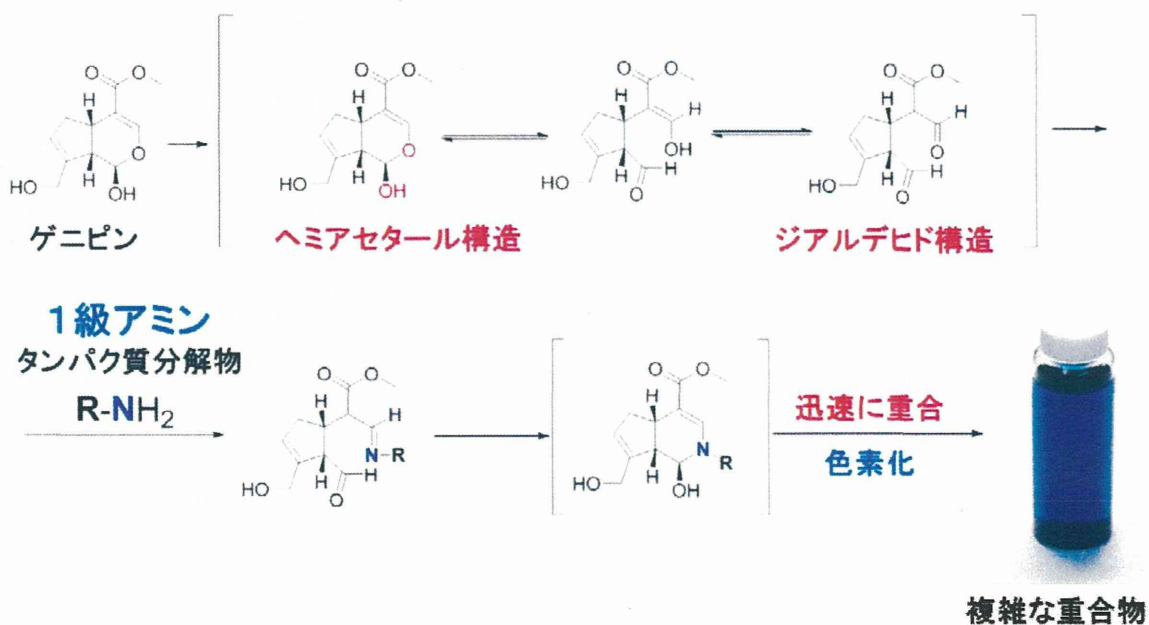


Fig. 2 Proposed reaction mechanism between genipin and a primary amine to produce blue pigments