

neoisoliquiritin apioside は、この測定条件では isoliquiritin apioside とほぼ同じ保持時間に溶出するが、LC/TOF-MS の条件では、保持時間が 1 分離れ、なおかつ KZ09 の EtOH 抽出液からは検出されなかったため、KZ09-peak-II を isoliquiritin apioside と同定した。

KZ09-peak-III は分子式  $C_{21}H_{22}O_9$  と推定され、比較標品として isoliquiritin と neoisoliquiritin が入手できた。peak-II と同様、この条件では isoliquiritin と neoisoliquiritin はほぼ同じ保持時間に溶出するが、LC/TOF-MS の条件では、保持時間が 1 分離れ、なおかつ KZ09 の EtOH 抽出液からは検出されなかったため、peak-III は isoliquiritin と同定した。

KZ09-peak-VI は、 $C_{21}H_{20}O_6$  と推定され、glycycoumarin と一致した。

#### C-4. LC/TOF-MS/MS による MS スペクトルの比較

C-3 において製品中の抗酸化活性成分のいくつかについて推定はできたが、標品、カンゾウ製品分画物共に少量であり NMR 測定には不十分であった。そこで製品の分析で抗酸化活性に重なるピーク化合物と推定化合物の試薬または単離標品について LC/TOF-MS/MS 測定を行い、product ion scan の MS スペクトルが一致するか否かを確認した。

標品 licochalcone B と、抗酸化活性が認められたカンゾウ油性抽出物画分

(KZ01-frc11-⑦と KZ34-frc11-⑦) の product ion scan の MS スペクトルを比較したところ、フラグメントイオンまで一致し、KZ01-frc11-⑦と KZ34-frc11-⑦の主ピ

ーク成分は licochalcone B であると同定された。同様に標品 licochalcone A と KZ01-frc34-⑦、標品 licochalcone C と KZ01-frc34-④、⑤、標品 licochalcone D と KZ01-frc28-⑥、標品 glabrone と KZ01-frc37&38-⑦、標品 glabridin と KZ01-frc37&38-④、KZ34-frc37-③、④、標品 kanzonol X と KZ34-frc44&45-⑦、標品 hispaglabridin A と KZ34-frc52-④の MS/MS スペクトルをそれぞれ比較したところ、いずれも標品と画分でよく一致し、製品中の抗酸化成分は上記の各化合物であると同定された。

#### D. 結論

既存添加物カンゾウ油性抽出物 2 製品及び生薬カンゾウの EtOH 抽出物中の成分につき LC/TOF-MS (MS) を用いて精密質量による組成解析から含有成分の推定を行い、市販試薬及び供与された単離標品との結果の比較により確認を行った。その結果、カンゾウ油性抽出物製品 KZ01 中の抗酸化活性成分として 6 化合物 (licochalcone A, licochalcone B, licochalcone C, licochalcone D, glabridin, glabrone), KZ34 中の抗酸化活性成分として 4 化合物 (licochalcone B, glabridin, kanzonol X, hispaglabridin A) を同定できた。また活性には寄与しないが製品中の成分として wighteone), glabrol が確認された。生薬カンゾウ KZ09 の EtOH 抽出液中の UV クロマトグラム の 主 要 ピーク として 7 化 合 物 (liquiritin apioside, liquiritin, isoliquiritin apioside, isoliquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, glycycoumarin) が帰属できた。

## E. 参考文献

- 1) 多田敦子, 受田浩之, 島村智子, 石附京子, 杉本直樹 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の分離, 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 既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究 平成 26 年度 総括・分担研究報告書 59-63 (2015)
- 2) 多田敦子, 受田浩之, 島村智子, 石附京子, 杉本直樹 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明, 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 25 年度 総括・分担研究報告書 15-23 (2014)
- 3) 多田敦子, 石附京子 既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分解析, 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 総括・分担研究報告書 87-98 (2012)
- 4) 多田敦子, 石附京子, 杉本直樹 既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分解析, 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 既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分解析と基原の確認 平成 24 年度 総括・分担研究報告書 98-103 (2013)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 多田敦子, 石附京子, 杉本直樹, 吉松嘉代, 川原信夫, 末松孝子, 有福和紀, 深井俊夫, 田村幸吉, 大槻崇, 田原麻衣子, 山崎壮, 穂山浩, 既存添加物カンゾウ油性抽

出物の成分組成の多変量解析に基づく基原植物種の検討, 日本食品衛生学雑誌, 56, 217-227 (2015)

- 2) 多田敦子, 杉本直樹, 小林義和, 濱田ひかり, 石附京子, 秋山卓美, 伊藤裕才, 川原信夫, 山崎壮, 穂山浩, 味認識装置による既存添加物苦味料及び関連苦味化合物の品質評価, 日本食品化学学会誌, 22, 25-31 (2015)

### 2. 学会発表

- 1) Tada A., Sugimoto N., Nishizaki Y., Matsuda S., Kawasaki H., Ishizuki K., Ohtsuki T., Tahara M., Suematsu T., Yamada Y., Akiyama H.: Examination of quantification methods of quercetin in food additives and reagents using <sup>1</sup>H quantitative NMR. Pacifichem 2015 (2015.12)

Table 1 入手した試薬・単離化合物

化合物番号	化合物名	分子式	ExactMass	NMR重溶媒	NMR
					構造確認
4	Liquiritigenin (試薬)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	256.0736		
5	Isoliquiritigenin (試薬)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	256.0736		
1	Liquiritin (試薬)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	418.1264		
3	Isoliquiritin	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	418.1264		
14	Neoisoliquiritin	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	418.1264	MeOH-d <sub>4</sub>	○
13	Liquiritin apioside	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	550.1686		
2	Isoliquiritin apioside	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	550.1686		
15	Neoisoliquiritin apioside	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	550.1686	MeOH-d <sub>4</sub>	○
6	Glycycoumarin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	368.1260		
8	Licochalcone A (試薬)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	338.1518		
31	Licochalcone C	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	338.1518	アセトン-d <sub>6</sub>	○
32	4'-O-Methylglabridin	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	338.1518	CDCl <sub>3</sub>	○
9	Glabridin (試薬)	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	324.1362		
10	Hispaglabridin A	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	392.1988	CDCl <sub>3</sub>	△
29	Glabrol	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	392.1988	CDCl <sub>3</sub>	△
16	Licochalcone B	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	286.0841	アセトン-d <sub>6</sub>	○
17	2'-O-Methylcodione	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	286.0841	アセトン-d <sub>6</sub>	○
18	Glyasperin B	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	370.1416	アセトン-d <sub>6</sub>	△
19	Licochalcone D	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	354.1467	MeOH-d <sub>4</sub>	○
20	1-Methoxyphaseollidin	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	354.1467	CDCl <sub>3</sub>	△
21	Gancaonin I	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	354.1467	アセトン-d <sub>6</sub>	○
22	Gancaonin E	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	424.1886	アセトン-d <sub>6</sub>	△
23	Glisoflavanone	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	424.1886	アセトン-d <sub>6</sub>	△
24	3',8-Diprenyl dalbergoidin	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	424.1886	アセトン-d <sub>6</sub>	○
25	Glabrone	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	336.0998	アセトン-d <sub>6</sub>	○
26	Kanzonol W	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	336.0998	アセトン-d <sub>6</sub>	△
27	Wighteone	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	338.1154	MeOH-d <sub>4</sub>	○
28	Glyinflarin B	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	338.1154	アセトン-d <sub>6</sub>	○
30	Kanzonol X	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	394.2144	アセトン-d <sub>6</sub>	△

Table 2 LC/MS/MS 設定条件

化合物	移動相	Collision (V)	Precursor ion	
			pos.	neg.
Licochalcone B	0.05%ギ酸含有 20%アセトニトリル	20	287.10	285.10
Licochalcone A	0.05%ギ酸含有 35%アセトニトリル	30	339.15	337.15
Licochalcone C	0.05%ギ酸含有 35%アセトニトリル	30	339.15	337.15
Licochalcone D	0.05%ギ酸含有 35%アセトニトリル	20	355.15	353.15
Glabrone	0.05%ギ酸含有 35%アセトニトリル	30	337.10	335.10
Glabridin	0.05%ギ酸含有 35%アセトニトリル	20	325.15	323.15
Kanzonol X	0.05%ギ酸含有 45%アセトニトリル	20	395.20	393.20
Hispaglabridin A	0.05%ギ酸含有 50%アセトニトリル	25	393.20	391.20

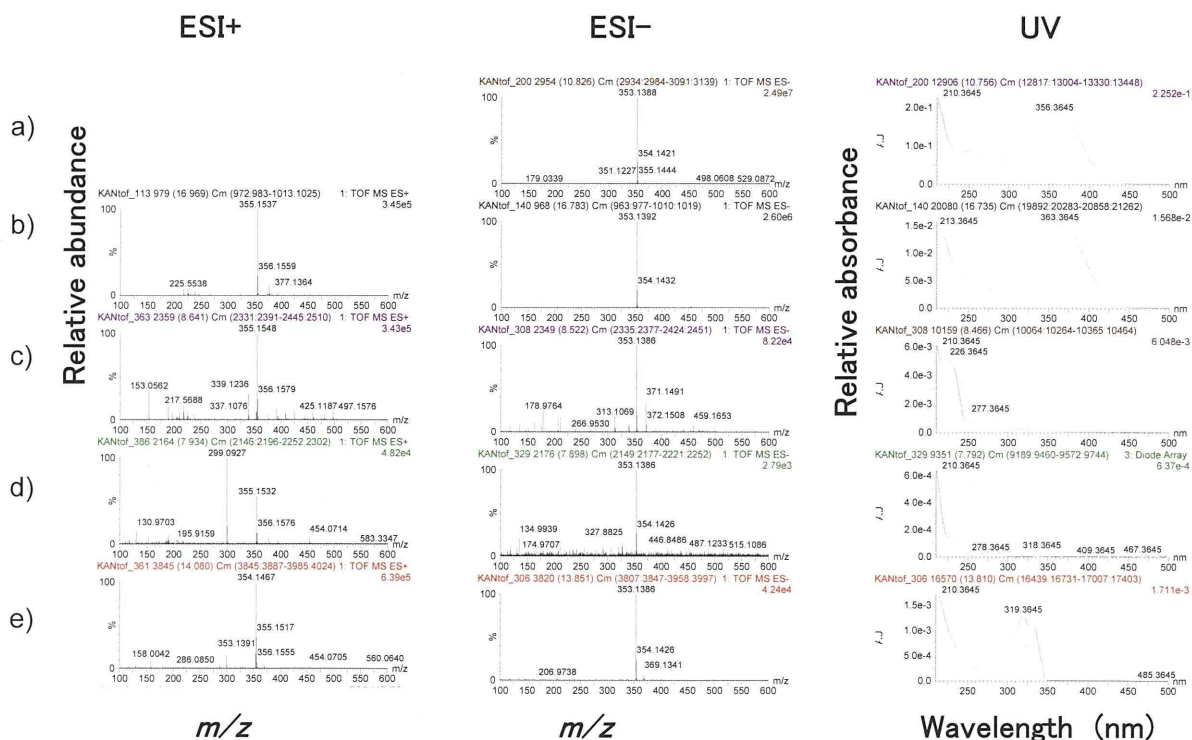


Fig. 1 カンゾウ油性抽出物の画分中で DPPH 活性が認められた成分の MS、UV スペクトル および推定分子式 ( $C_{21}H_{22}O_5$ ) に相当する入手できた標品のスペクトル  
 a) Licochalcone D, b) KZ01-frc31-④, c) KZ34-frc44&45-②, d) 1-Methoxyphaseollidin, e) Gancaonin I

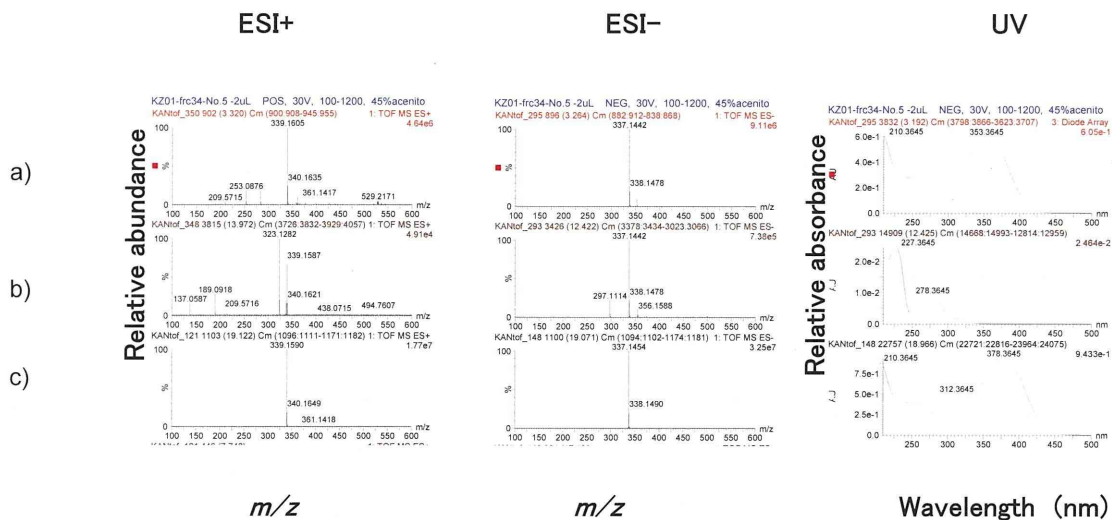


Fig. 2 カンゾウ油性抽出物の画分中で DPPH 活性が認められた成分の MS、UV スペクトル および推定分子式 ( $C_{21}H_{22}O_4$ ) に相当する入手できた標品のスペクトル  
 a) KZ01-frc34-⑤, b) 4'-*O*-methylglabridin, c) KZ01-frc34-⑦ (Licochalcone A と同定)

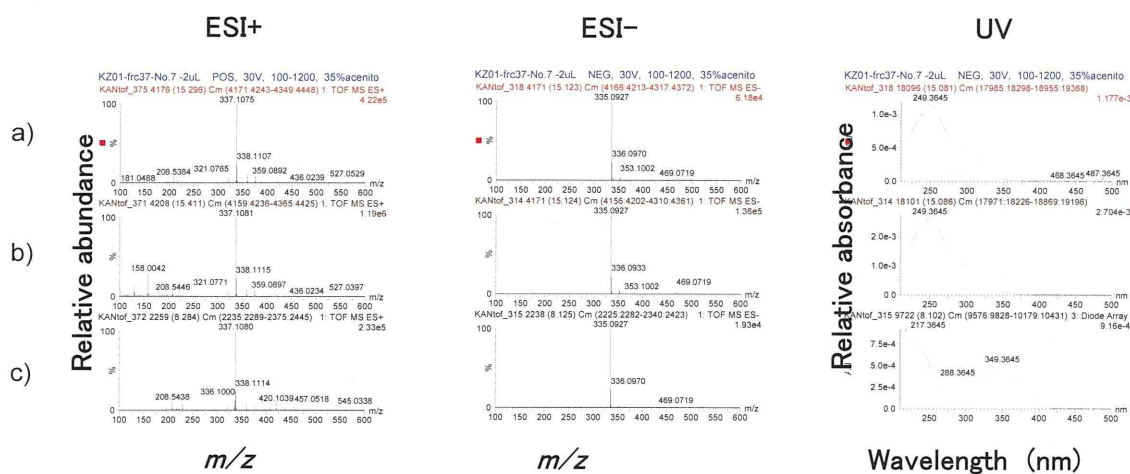


Fig. 3 カンゾウ油性抽出物の画分中で DPPH 活性が認められた成分の MS、UV スペクトル  
 および推定分子式 ( $C_{20}H_{16}O_5$ ) に相当する入手できた標品のスペクトル  
 a) KZ01-frc37&38-⑦  
 b) Glabrone  
 c) Kanzonol W

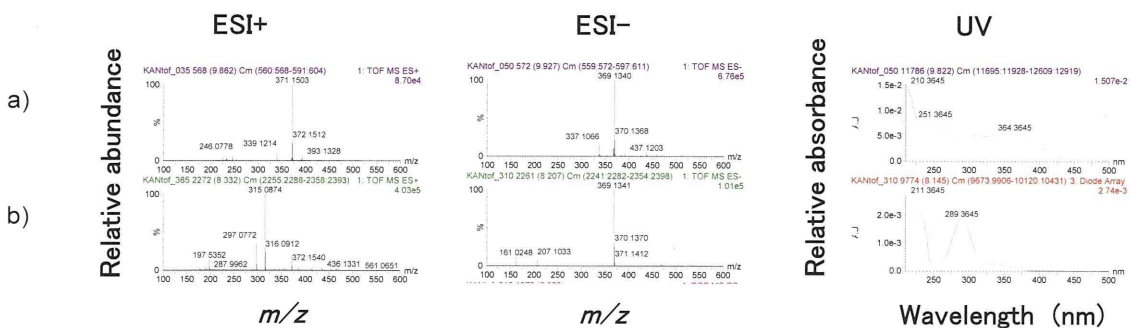


Fig. 4 カンゾウ油性抽出物の画分中で DPPH 活性が認められた成分の MS、UV スペクトル  
 および推定分子式 ( $C_{21}H_{22}O_6$ ) に相当する入手できた標品のスペクトル  
 a) KZ34-frc25-⑦  
 b) Glyasperin B

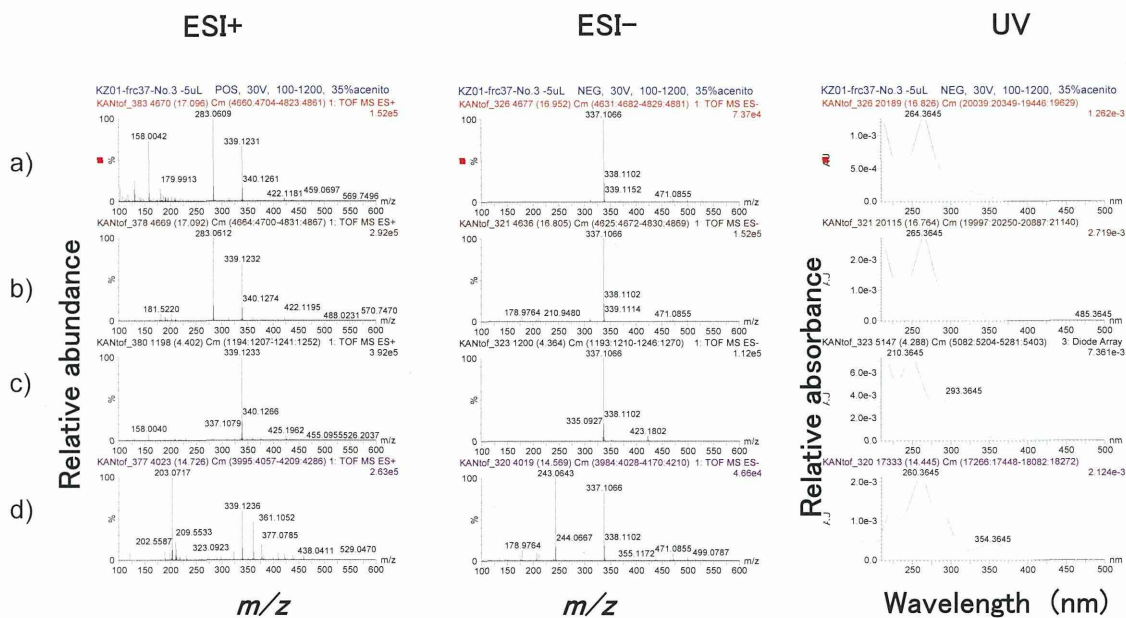


Fig. 5 カンゾウ油性抽出物の画分中で DPPH 活性が認められた成分の MS、UV スペクトル  
 および推定分子式 ( $C_{20}H_{18}O_5$ ) に相当する入手できた標品のスペクトル  
 a) KZ01-frc37&38-③  
 b) Wighteone  
 c) KZ34-frc25-⑦  
 d) Glyinflanin B

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)  
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究  
平成 27 年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法の検討

～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：中間体構造の解明～

研究分担者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究分担者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究協力者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究協力者 石附京子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

**研究要旨** 既存添加物クチナシ青色素は、ゲニピンと一級アミンの反応生成物が主色素成分とされるがその構造は未だ不明である。この主色素成分の生成過程および構造についての知見を得るため、ゲニピンとベンジルアミンを用いたモデル実験をおこなった。ゲニピンとベンジルアミンの混合液は、無色→黄色→赤色→緑色→青色へ経時的に変化した。この内、青色素の前駆体と考えられる黄色素Y1及びY2を単離し、その構造を決定した。また、ゲニピンとベンジルアミンを異なる比に調製した混合液の反応実験から、青色素本体がゲニピンと一級アミンがモル比1：1で反応したユニットの繰り返し構造であることが示唆された。

#### A. 研究目的

食品添加物として現在わが国で認められている青色素には、合成色素として「青色1号(Brilliant Blue FCF)」及び「青色2号(Indigo carmine)」の2種類、既存添加物として「クチナシ青色素」及び「スピルリナ色素」の2種類、一般飲食物添加物として「ブルーベリー色素」等のアントシアニン系の色素が19種類ある。近年の天然成分志向のため合成色素に代わり、天然由来色素の使用が望まれるが、フィコシアニン系の「スピルリナ色素」は温度、光、酸に対して不安定であり、また、アントシアニン系色素は、酸性でピンクや紫色へと変化することから使用範囲が限られている。一方、「クチナシ青色素」は植物由来であり、青色素の中では安定性及び吸光係数が高く、天然由来の青色素として有用である。

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β-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。青色素成分は、イリドイド配糖体のゲニポシド(geniposide)を原料としてアミノ酸が反応して生成するものと考えられているが、現時点では、この色素形成機構には不明な点が多く、クチナシ青色素の主色素成分の化学構造を決定した報告はない。

クチナシ青色素の生成機構を明らかにする目的で、Touyamaらはゲニピンとメチルアミンの系による一連の研究の結果、重合開始種として黄色素と赤色素9種の構造を報告している<sup>1,2)</sup>。また、Parkらもゲニピンとメチルアミンの系において、青色反応液から単離した黄色素を青色素の中間体であるとしている<sup>3)</sup>。Zhangらは、ゲニピンを含む計4種のイリドイドアグリコンとメチルアミンの反応から、青色素の生成には、ゲニピン-メチルアミンから生成する中間体ユニットの繰り返し

必要であると結論付けている<sup>4)</sup>。更に、Tommaso らはゲニピン-メチルアミンの反応機構をエンタルピー計算により推定している<sup>5)</sup>。このように以前からクチナシ青色素の生成機構について研究されているが、混合直後に出現する中間体の構造については一定の報告があるものの、その反応機構については結論が得られておらず、青色素成分は単離・同定されていない。したがって、食品中のクチナシ青色素の分析法も存在しない。クチナシ青色素の安全性と有効性を確認するためには、色素成分の化学構造および色素形成メカニズムを明らかにする必要がある。

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(benzylamine)を用いてモデル実験を行い、最初の生成物である黄色素の単離を行い、その構造を明らかにしたので報告する。

## B. 研究方法

### B-1) 試薬

本研究では、クチナシ青色素のモデル合成実験のため、ゲニピン(Wako, 078-03021, Lot : CTF5047)及びベンジルアミン(Wako, 029-05273, Lot : CTP1798)を用いた。NMR 重溶媒として、ベンゼン-*d*<sub>6</sub>(ISOTEC, 151815, Lot : MKBF9301)を用いた。その他溶媒はHPLCグレード、または特級を使用した。

### B-2) 装置

モデル実験により得られた生成物の分

析には以下の装置を用いた。LC/PDA, LC/MS, LC/TOF-MSの装置・分析条件をTable 1, 2, 3に示した。また、NMR測定には、JNM-ECZ600 (CH UltraCOOL probe, JEOL)又はECA800 (HX UltraCOOL probe, JEOL)を用いた。スペクトルの化学シフトはすべてnative scaleのまま $\delta$ 値をppm単位で表示した。

### B-3) ゲニピンとベンジルアミンの反応

MeOHを溶媒として、ゲニピン(0.02 mmol/mL)に対し、ベンジルアミン1/7~9モル当量の割合で混合し、密栓して冷蔵庫に静置した。45h経過後、反応液の一部をMeOHで20倍に希釈し、LC/PDAに付し、未反応原料及び反応生成物を観察した(Table 1)。

ゲニピンとベンジルアミンをモル比1:1(各0.1 mmol/20 mL in MeOH)に調製し、混合直後からのLC/PDAクロマトグラムの変化を観察した(Table 2)。反応初期から観察された主な2つのピーク(化合物Y1及びY2)の面積を求め、初期生成物の変化として経時的に測定した。また、この2つのピーク(Y1及びY2)について、精密質量測定を行い、化合物の組成式を推定した(Table 3)。

### B-4) 初期生成物の液-液抽出

ゲニピンとベンジルアミン(各0.1 mmol/5 mL in MeOH)混合液を青くなるまで十分放置し、水で20倍に希釈したものに、有機溶媒(クロロホルム, 酢酸エチル, ヘキサン, エーテル, トルエン, ベンゼン)を加え、青色素成分とそれ以外の化合物の分離が液-液抽出により可能かどうか



か検討した。

#### B-5) 初期生成物の TLC 分析

反応初期に生成する黄色成分の分離条件を、Si-TLC で検討した。ゲニピンとベンジルアミンの青変前(黄色～赤色)の反応液を Si-TLC に付し、エーテル/ヘキサン(5:1)、または酢酸エチル/ヘキサン(1:1)で展開した。なお、TLC プレートには、Silica gel 60 F254 (MERCK, #5715, 20 x 20 cm, 250 μm) を 1 × 5 cm にカットしたものをを用いた。

#### B-6) 化合物 Y1 及び Y2 の単離精製

ゲニピンとベンジルアミン各 1 mmol を MeOH 2 mL に溶かし、約 5 分後、混合液が黄色くなった頃に減圧乾固し、少量の展開溶媒に再溶解したものを単離精製の試料液とした。試料液をシリカゲルを担体とするオープンカラムに付し、エーテル/ヘキサン(5:1)または酢酸エチル/ヘキサン(1:1)により溶出させ、減圧乾固し Y1, Y2 画分を得た。なお、オープンカラムには、シリカゲル 60 (0.063-0.200 mm, MERCK, 1.07734.1009) をカラム管(φ20 mm)に 140 mm 充填したものをを用いた。

各画分を重ベンゼン溶媒に溶かし、各種 NMR スペクトル(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMBC, INADEQUATE, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC, NOE)を測定し、構造解析を行った。また別に、同様の反応液を十分青くなるまで放置し、水で大希釈後、エーテル抽出して得られた黄色溶液について分画を行い、Y1' を単離、構造解析した。

#### C. 結果及び考察

クチナシ青色素は、その定義によると、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タンパク質分解物(特定のアミノ酸ではなく、複数の混合物)を反応させて製造する。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、1級アミノ基であれば、低分子でもキトサンやタンパク質などの高分子でも青変する<sup>6-9)</sup>。生成物の単離を容易にするために、反応機構の研究には様々な研究者により、グリシンやメチルアミンなど単純な1級アミンを用いたモデル実験が行われてきた<sup>1-5,10)</sup>。

先の厚労科研報告<sup>11)</sup>では、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とベンジルアミンを用いてモデル実験を行った。ベンジルアミンを用いる利点は、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、比較的重合度の小さな化合物を与える、③NMR 解析の際、ベンゼン環の積分値から重合度を換算できる、④エチルアミン等の気体と異なり液体なので扱いが容易である、ことがあげられる。この研究報告において、生成される青色素成分について LC/MS により検討したが、青色素成分本体の化学構造の確定に至っていない。そこで、本研究では、先の報告に基づき、青色素生成の鍵となる前駆体化合物の構造を決定することとした。

### C-1) ゲニピンとベンジルアミンの反応比

ゲニピンとベンジルアミンを MeOH に溶解した混合液は、反応の進行と共に無色透明から淡黄色、黄色、橙色、赤色、深緑色、青色へと変化した。青色素の生成に必要な原料、すなわち、ゲニピンとベンジルアミンの反応比を調べるため、モル比を変えた混合液を調製し、その反応を観察した。

混合モル比の異なる反応液を LC/PDA 分析 (Table 1) したところ、ゲニピンは 13.8 分、ベンジルアミンは 3.1 分に検出された (Fig. 1)。反応開始後 45 h では、ゲニピンに対してベンジルアミンが過剰な反応液の色の変化は遅く、黄～赤色となったが、ゲニピンに対してベンジルアミンが等モル以下の反応液は青色に変化した。これらの 45 h 後の反応液を MeOH で 20 倍希釈し、HPLC/PDA に付したところ、14.3 分、18.8 分 (Y1 と命名) 及び 19.7 分 (Y2 と命名) に反応生成物と思われる新たなピークが出現した (Fig. 1)。これらのピークは、500～600 nm に吸収がなく、青色素成分ではなかった。また、混合モル比の異なる反応液中の 45 h 後の未反応のゲニピンとベンジルアミンのピーク面積をプロットしたところ、モル比 1:1 の時に両者が消失していることが確認され、この結果より、青色素は、たとえどちらかが過剰に存在したとしてもゲニピン:ベンジルアミン=1:1 で生成するものと示唆された (Fig. 2)。

### C-2) 化合物 Y1 及び Y2 の生成量の変化

次に、ゲニピン及びベンジルアミンを当モル量 (1:1) に混合した液を調製し、

LC/MS に付し、反応開始直後からの変化を調べた (Fig. 3, Table 2)。なお、反応液は、希釈せずにそのまま LC/MS に導入できるように、C-1) の時よりも薄い濃度に調製した。

反応液について、反応開始直後から経時的にその色調を観察し、青色に変化するまでの色の变化、その PDA (190-800nm) クロマトグラム、観察されたピーク Y1 及び Y2 の PDA 及び MS スペクトルを Fig. 3 に示した。ベンジルアミンは 2.0 分に、ゲニピンは 3.8 分に観察された。また、Fig. 1 に示す HPLC/PDA クロマトグラムで 18.8 分及び 19.7 分に観察された Y1 及び Y2 は、この分析条件では 12.1 分及び 14.0 分に観察された。Y1 及び Y2 は 2 つとも反応開始直後から生成されており、ゲニピンの減少とともに増加した。また、反応を続けると、Y2 が減少し青色になることがわかった。Y1 は反応液の色が黄色に変わるころまでに最大量になり、その後増減がなくなるが、Y2 は液色が赤色のとき最大量になり、その後、液色が緑→青色に変化するに従い減少した。Y1 及び Y2 の PDA (190-800 nm) におけるピーク面積値の変化を Fig. 4 に示したが、ゲニピンとベンジルアミンの混合液が青変する前に黄～赤色に着色後、Y1 及び Y2 が出現することから、Y1 及び Y2 は青色素成分の前駆物質と考えられた。すなわち、反応初期において、ゲニピンとベンジルアミンが 1:1 で反応した前駆物質が生成・蓄積され、その後、この前駆物質が重合、あるいは構造変換されて青色素成分になると考えられた。

Y1 及び Y2 について精密質量を測定し

たところ、組成式はそれぞれ  $C_{18}H_{21}NO_4$  及び  $C_{18}H_{19}NO_3$  と推定された (Table 4). ゲニピンが反応液中でジアルデヒド構造に開裂し、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ていると考え、Y1 及び Y2 の構造は Fig. 5 のように推定された。

青色素への反応は連鎖的に進行するため、青色素の前駆物質の単離は非常に困難であり、反応初期にこれら前駆物質について NMR スペクトルにより完全帰属した例はない。そこで、Y1 及び Y2 の推定構造が正しいかどうか単離・生成し構造決定することとした。

### C-3) Y1 及び Y2 の単離・精製法の検討

C-2) の実験において、反応液が青変してからも Y1 は存在することが確認されている。一方、ゲニピンとメチルアミンのモデル実験の報告では、生成した青色溶液から Y1 に相当するものと思われる化合物の構造を決定している<sup>3)</sup>。このことから、Y1 が青色素成分の前駆物質であるか、また、青色素成分とは関係しない副反応生成物なのかを明らかにする必要がある。

そこで、液-液分配により、Y1 が分配抽出できるかどうか検討した。青色に着色した反応液を過剰の水で大希釈し、各種有機溶媒で液-液分配を試みたところ、その有機相は、ヘキサンでは無色、エーテル、トルエンまたはベンゼンでは黄色になり、青色素成分とは異なる黄色成分が分配できることがわかった。また、クロロホルムまたは酢酸エチルでは、有機相に水相と同じように青色成分が分配されることがわかった。

エーテル、トルエンまたはベンゼンで分配された黄色溶液は、約 1 日間は黄色を呈したが、MeOH を加える等により溶媒組成を変えた場合や、空気に触れた容器面から徐々に青変した。また、TLC により、ゲニピン及びベンジルアミンの反応初期段階の黄色に着色した混合溶液と、青変した反応混合液からエーテル抽出した黄色溶液を展開 (展開溶媒: エーテル/ヘキサン (5:1) したところ、反応初期段階の黄色混合溶液は、主に Y1 ( $R_f = 0.19$ ) 及び Y2 ( $R_f = 0.33$ ) に相当すると考えられる 2 成分、エーテル抽出した黄色溶液は主に Y1 ( $R_f = 0.19$ ) に相当すると考えられる 1 成分からなることが確認された。

また、TLC 上に展開された両スポットは、展開直後は UV 検出～黄色であったが、約 10 分空気中でそのまま放置すると青色に変化した。このことから、Y1 ( $R_f = 0.19$ ) 及び Y2 ( $R_f = 0.33$ ) に相当すると考えられる 2 成分が非常に不安定であり、青色に変化することから、青色素成分の前駆体であることが示唆された。一方、Y1 及び Y2 に相当する成分は、その精製過程及び NMR 測定中にも変化するものであると考えられ、その構造解析は非常に困難であることが示唆された。これらを単離・精製するためには、反応液の色調が黄～赤色の段階で反応を停止させる必要があり、そのためには、①ベンジルアミンを過剰に加え反応液をアルカリ性にする、②反応液中のゲニピン及びベンジルアミンの濃度を高くする、③脱酸素 ( $N_2$  または Ar 気流) 下で反応させる、④低温で反応させる、⑤反応液をエーテル、トルエンまたはベンゼン溶液に置き換える、等の方

法が考えられた。しかし、いずれの方法においても完全に反応停止できず、溶媒組成の変化や、空気に触れたりすると、その青色への変化の速度の差はあるがすべて青変することがわかった。

#### C-4) Y1, Y1' 及び Y2 の単離・精製

青色素成分の前駆体と考えられる Y1 及び Y2 を逆相系の ODS カラムを担体とした分取 HPLC により分取したが、水を含む溶出液を乾固させている途中で青くなり、それぞれを単離することができなかった。そこで、順相系の Si オープンカラムを用い、沸点が低く分取した画分を乾固させ易い有機溶媒(エーテル/ヘキサン(5:1) または酢酸エチル/ヘキサン(1:1))を溶出液として分画することにした。

ゲニピン及びベンジルアミンの初期段階の黄色の反応混合液を減圧乾固し、Si オープンカラムに付した。溶出させた Y1 及び Y2 画分を直ちに減圧乾固した。NMR 測定のために、乾固した Y1 及び Y2 画分を MeOH- $d_4$  や  $CDCl_3$  に溶解したところ、数分で緑～青色への変化が開始したため、減圧乾固後はその容器内を速やかに  $N_2$  パージし、 $N_2$  バブリングした  $C_6D_6$  に溶かし、さらに  $N_2$  パージした 5 mm  $\phi$  NMR 試料管に封入し、直ちに NMR 測定を行った。または、直ちに NMR 測定ができず、単離・精製した Y1 及び Y2 を保管する場合は、乾固した状態で容器内を  $N_2$  パージし、密封・冷凍保存した。

また、反応初期に生成すると考えられる Y1 と、反応後期の青色溶液中にも存在する黄色物質 Y1' が同じ物質であるかどうかを確認するため、ゲニピンとベンジ

ルアミンの青色反応液からエーテル抽出した黄色溶液を、同条件の Si オープンカラムに付し、Y1' を精製し NMR 測定した。

#### C-5) NMR スペクトルの帰属

C-4) で単離した Y1, Y2 及び Y1' について、各種 NMR スペクトル( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY,  $^1H$ - $^{13}C$ -HMQC,  $^1H$ - $^{13}C$ -HMBC, INADEQUATE,  $^1H$ - $^{15}N$ -HMBC, 差 NOE (Y1 のみ))を測定し、それぞれの構造を確認した (Table 5, Fig. 5)。その結果、Y1 = Y1' であり、Y2 は Y1 が脱水し 1 位と 9 位の間が二重結合になったものであった。

Y1 には、1 位及び 9 位のプロトンが *cis* 配置のものと *trans* 配置のものが考えられる。そこで、1 位のプロトンを励起させた差 NOE スペクトルを測定したところ、9 位のプロトンシグナルに強い相関が観察され、1 位と 9 位のプロトンは空間的に近い *cis* 配置をとっていることが確認された。1 位及び 9 位のプロトンが *trans* 配置の成分が存在しなかったことから、1 位と 9 位のプロトン同士が *cis* 配置の Y1 は、1 位の OH 基と 9 位の H が *trans* 配置となり、立体的に遠いため、Y2 への脱水反応が起こりにくいと考えられた。

#### D. 結論

ゲニピンとベンジルアミンを用いたモデル実験の結果、以下の反応機構が示唆された。

ゲニピンは、ベンジルアミンの 1 級アミンと反応し、閉環した後、Y1 とその異性体が生成する。次に、1 位の OH 基と 9 位のプロトンが *cis* 配置した Y1 異性体は、速やかに脱水し Y2 となり、その後、青色

素成分へ変化または重合していくと考えられた。また、Y1 から Y2 への脱水反応は遅く、一方、Y2 から青色素成分への変化または重合は早いと考えられる (Fig. 6)。したがって、今回、単離した Y1 及び Y2 は、共に青色素成分の前駆体であると考えられた。

#### E. 参考文献

- 1) Touyama, R., Takeda, Y., Inoue, K., Kawamura, I., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Shingu, T., Yokoi, T., Inouye, H.: Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**(3), 668-673(1994).
- 2) Touyama, R., Inoue, K., Takeda, Y., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Moritome, N., Shingu, T., Yokoi, T., Inouye, H.: Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II. On the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**(8), 1571-1578(1994).
- 3) Park, J.-E., Lee, J.-Y., Kim, H.-G., Hahn, T.-R., Paik, Y.-S.: Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia jasminoides*, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(22), 6511-6514(2002).
- 4) Zhang, B., Xu, L., Ding, K., Dyeing/cross-linking properties of natural iridoids to protein fibers. Part II. Color-forming rules and mechanism of methylamine and protein fibers dyed by four natural iridoids, *JALCA*, **106**(10), 303-310(2011).
- 5) Tommaso, S., David, H., Gomar, H., Leroy, F., Adamo, C.: From iridoids to dyes: a theoretical study on genipin reactivity, *RSC Adv.*, **4**(22), 11029-11038(2014).
- 6) Fujikawa, S., Nakamura, S., Koga, K.: Genipin, a new type of protein crosslinking reagent from gardenia fruits, *Agric. Biol. Chem.*, **52**(3), 869-870(1988).
- 7) Mi, F.-L., Sung, H.-W., Shyu, S.-S.: Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **38**(15), 2804-2814(2000).
- 8) Butler, M., Ng, Y.-F., Pudney, P.: Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **41**(24), 3941-3953(2003).
- 9) Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Peng, C.-K.: Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **43**(10), 1985-2000(2005).
- 10) Fujikawa, S., Fukui, Y., Koga, K.,

Iwashita, T., Komura, H., Nomoto, K.: Structure of genipocyanin G1, a spontaneous reaction product between genipin and glycine, *Tetrahedron Letters*, 28(40), 4699-4700(1987).  
11) 杉本直樹, 多田敦子: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-, *H17年度科研費報告書*, 42-53(2006).

## F. 研究業績

### 1. 論文発表

1) Kawasaki, H., Akiyama, T., Tada, A., Sekiguchi, W., Nishizaki, Y., Ito, Y., Sugimoto, N., Akiyama, H.: Development of HILIC-LC/MS method for direct quantitation of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in caramel III with the qNMR certified standard. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 22(2), 115-122 (2015).

### 2. 学会発表

1) 田邊思帆里, 多田敦子, 古庄紀子, 建部千絵, 西川真寿美, 荒井なぎさ, 西崎雄三, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩:食品添加物公定書における一般試験法の国際整合性に関する研究:粘度測定法. 日

本食品化学学会第21回総会・学術大会(2014.5)(東京).

2) Sugimoto, N., Takada, M., Ishizuki, K., Ohtsuki, T., Tada, A., Nishizaki, Y., Suematsu, T., Miura, T., Yamada, Y., Horinouchi, T., Koike, R., Kato, T., Togawa, T. Akiyama, H.: "AQARI" vs. "PULCON", a comparison of qNMR: internal and external reference methods. *Pacificchem2015* (2015.12)(Hawaii).

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

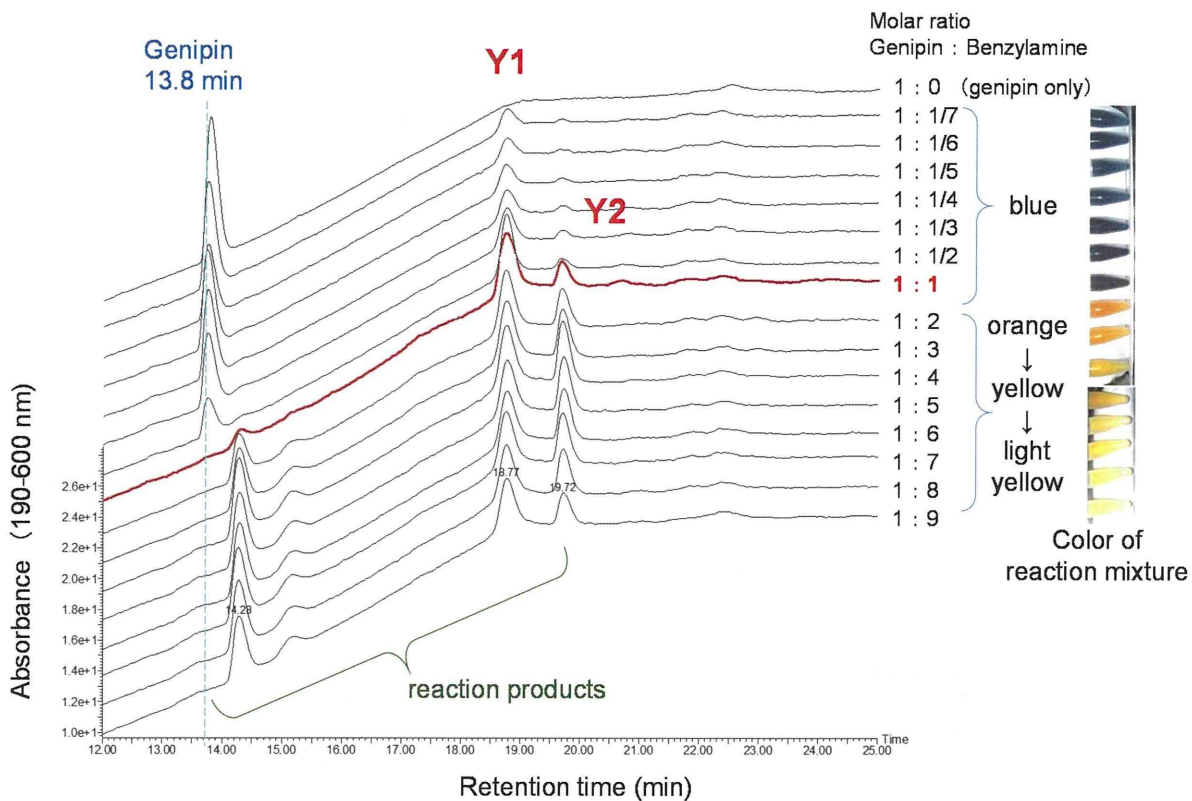


Fig. 1 LC/PDA profiles of reaction mixture under various mixing ratio of genipin and benzylamine

The MeOH solution (genipin 0.02 mmol/mL : benzylamine 0.003-0.18 mmol/mL) was reacted at 4 °C for 45 hrs. The diluted reaction solutions with MeOH were injected into HPLC/PDA. The HPLC conditions were shown in Table 1.

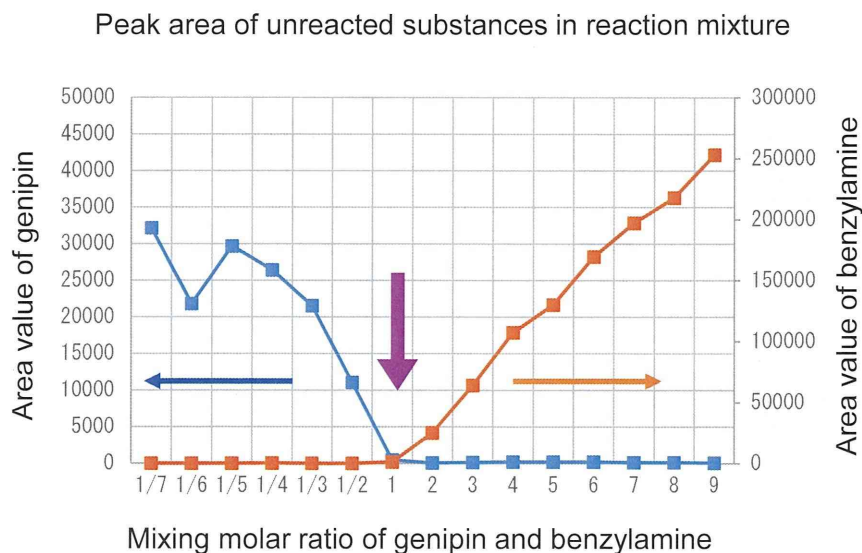


Fig. 2 Change of the peak area of unreacted substances, genipin and benzylamine. The peaks of genipin (13.8 min) and benzylamine (3.1 min) were observed on HPLC/PDA.

(Fig. 1), and the area values were plotted.

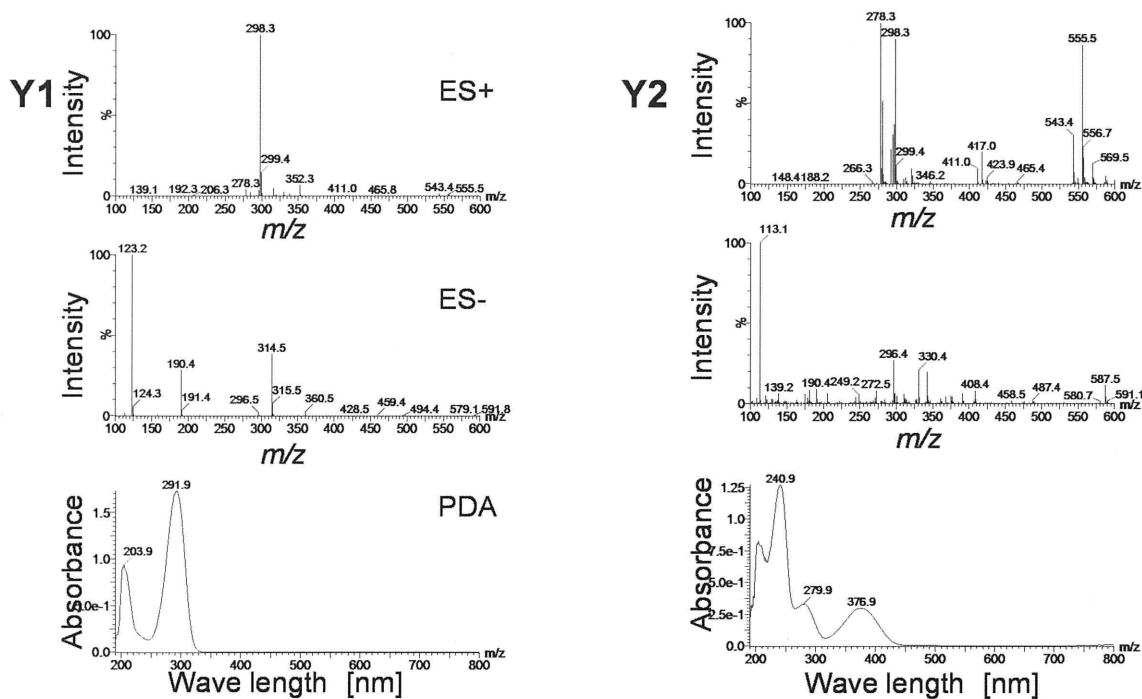
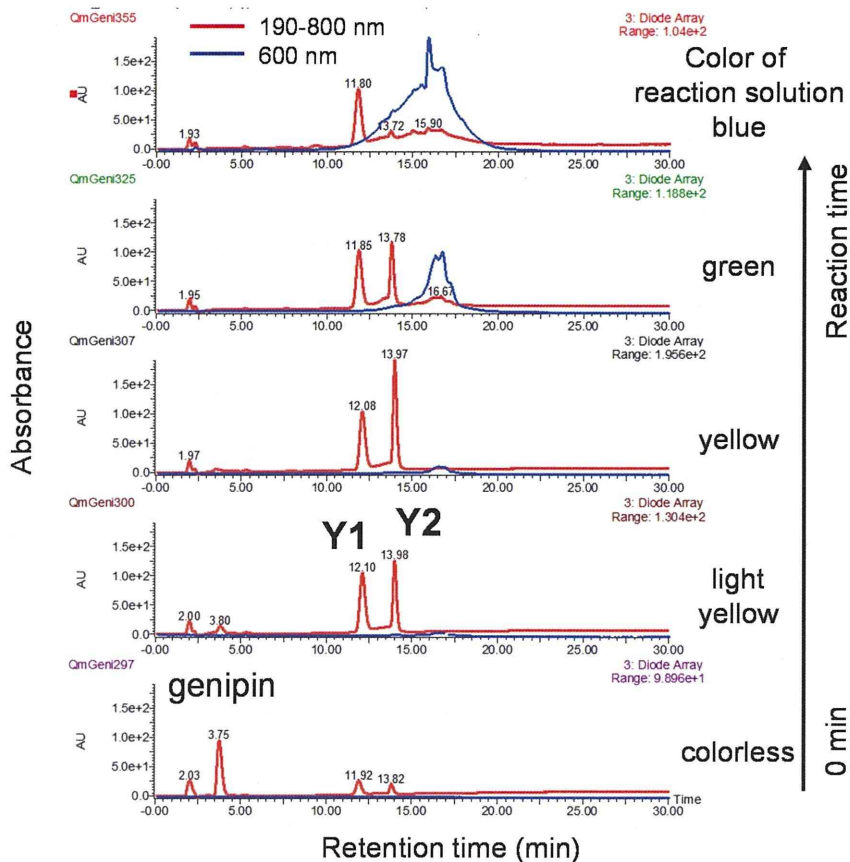


Fig. 3 HPLC profiles of reaction mixtures (genipin : benzylamine = 1 : 1) and mass spectra of peak Y1 and Y2

The concentrations of genipin and benzylamine were 0.1 mmol/20mL in reaction solution. The HPLC profiles were recorded on LC/MS conditions shown in Table 2. Red and blue lines were total chromatogram of 190–800 nm and extracted chromatogram at 600 nm,



respectively.

colorless → yellow → red → → dark green → → → blue

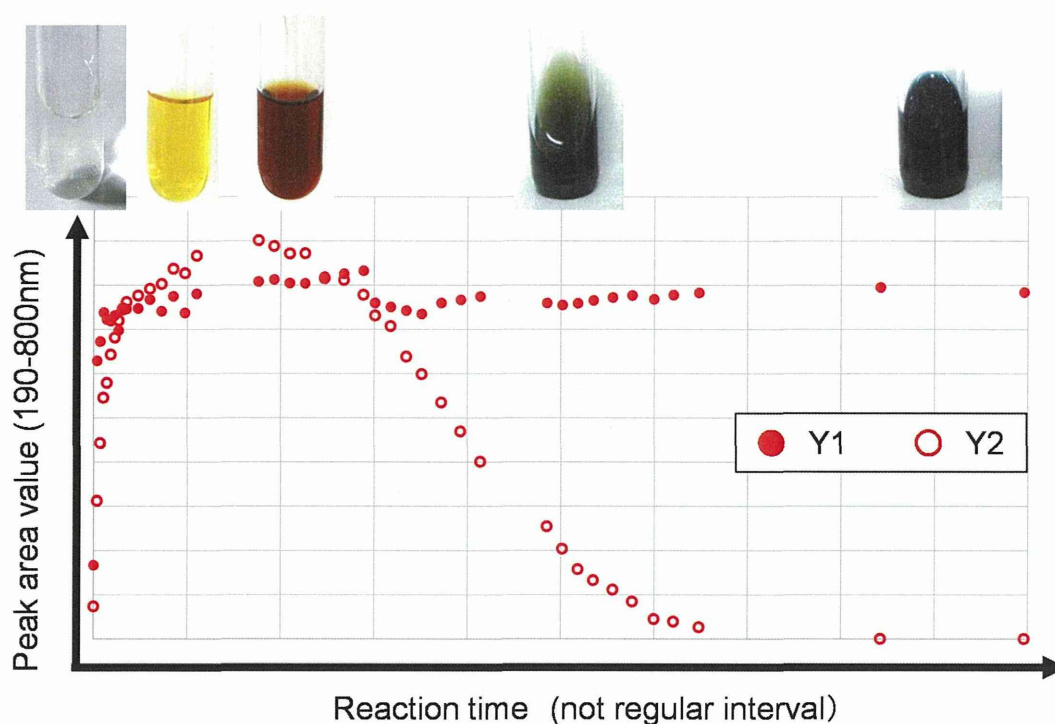


Fig. 4 Change with reaction time of peak area values of Y1 and Y2

The reaction solution consisted of 0.1 mmol/20mL of genipin and benzylamine. The values were recorded on LC/MS conditions shown in Table 2.

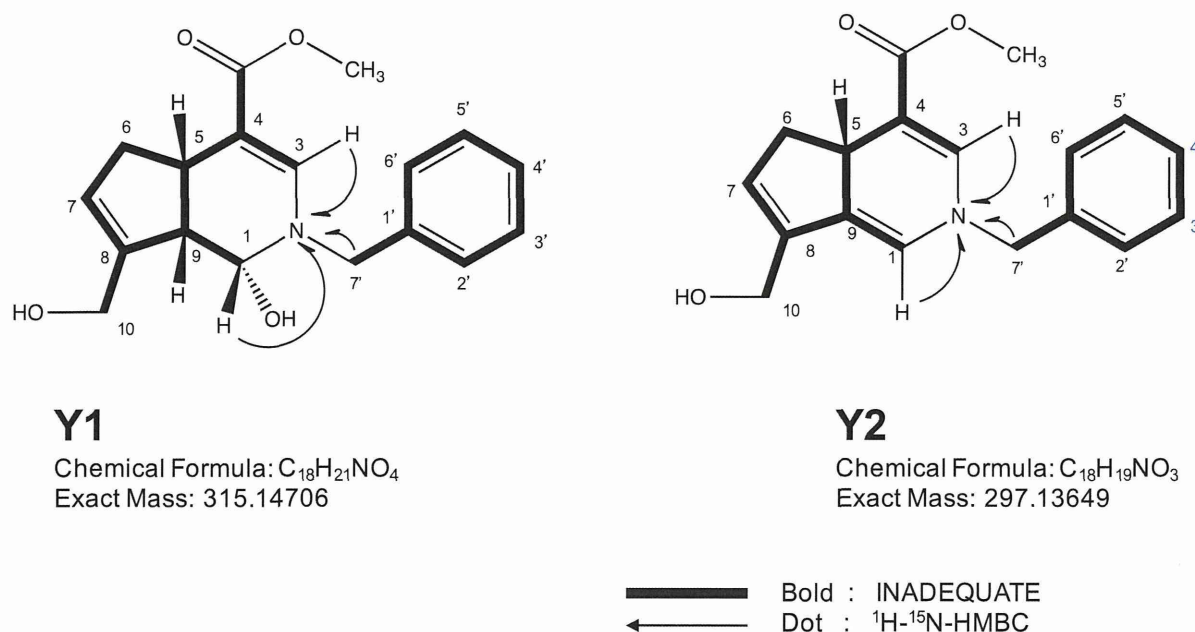


Fig. 5 Structures of compound Y1 and Y2

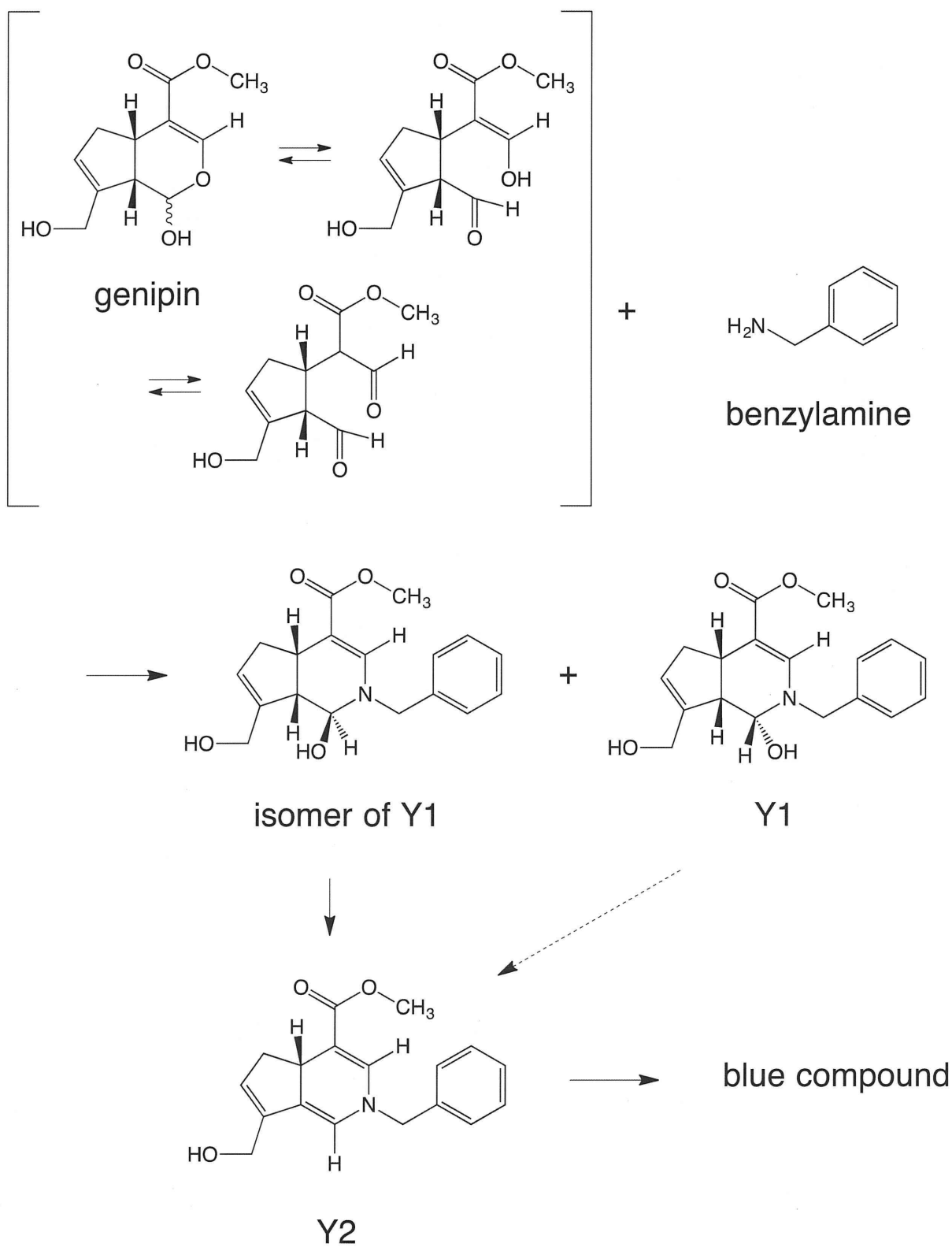


Fig. 6 Estimated reaction pathway of blue compound generation from genipin and benzylamine

Table 1 LC/PDA conditions

LC/PDA system	Waters LC : Alliance 2695, PDA : 2996 photodiode array detector
Column	Atlantis T3 (2.1×150 mm, 3 μm, Waters)
Column temp.	40°C
Solvent	A : 0.1% HCOOH/H <sub>2</sub> O B : 0.1% HCOOH/MeOH gradient : B 5% (0-2m in) → 70% (15-23m in)
Flow rate	0.3 mL/min
PDA scan	190-600 nm

Table 2 LC/MS conditions

LC/MS system	Waters LC : Alliance 2695, PDA : 2996 photodiode array detector, MS : Quattro micro <sup>TM</sup>
Column	Atlantis T3 (2.1×150 mm, 3 μm, Waters)
Column temp.	40°C
Solvent	A : 0.1% HCOOH/H <sub>2</sub> O B : 0.1% HCOOH/MeOH gradient : B 50% (0-3m in) → 95% (15-25m in)
Flow rate	0.2 mL/min
PDA scan	190-800 nm
Capillary voltage	3.0 kV (Pos.), 2.5 kV (Neg.)
Cone voltage	20 V (Pos.), 30 V (Neg.)
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	350°C
Desolvation gas flow	400 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Ion mode	ESI
MS scan	<i>m/z</i> 100-1000

Table 3 LC/TOF-MS conditions

LC/MS system	Waters UPLC : ACQUITY H-CLASS, PDA : ACQUITY eλ, TOF-MS : Xevo-G2 QTOF
Column	ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×50 mm, 1.7 μm, Waters)
Column temp.	35°C
Solvent	A : 0.1% HCOOH/H <sub>2</sub> O B : 0.1% HCOOH/CH <sub>3</sub> CN gradient : B 5% (0-1m in) → 95% (10-16m in)
Flow rate	0.2 mL/min
PDA scan	210-800 nm
Capillary voltage	3.0 kV (Pos.), 2.5 kV (Neg.)
Cone voltage	30 V
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	450°C
Desolvation gas flow	800 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Ion mode	ESI (Resolution mode)
MS scan	<i>m/z</i> 100-1200

Table 4 LC/TOF-MS analysis of compound Y1 and Y2

	R.T. (min)	Observed value			Theoretical value				
		[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	λmax (nm)	Formula	[M+H] <sup>+</sup>	Residual (mDa)	[M-H] <sup>-</sup>	Residual (mDa)
Benzylamine	1.2	108.0812	-	210	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N	108.0813	-0.1		
Genipin	4.9	249.0715	225.0780	242	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	*249.0739	-2.4	225.0763	1.7
from genipin and benzylamine mixture									
-	5.8	280.1342	-	276	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub>	280.1338 <sup>r</sup>	+0.4		
Y1	6.5	316.1544	314.1410 <sup>r</sup>	290	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub>	316.1549	-0.5	314.1392 <sup>r</sup>	+1.8
Y2	7.3	298.1433	296.1269	241, 278, 375	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	298.1443	-1.0	296.1287	-1.8

\* : [M+Na]<sup>+</sup>Table 5 <sup>13</sup>C-NMR and <sup>1</sup>H-NMR of compound Y1 and Y2

position	Y1 in C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> (800MHz)				Y2 in C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> (800MHz)			
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (mult, J [Hz])	COSY	HMBC (H→C)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (mult, J [Hz])	COSY	HMBC (H→C)
Genipin								
1	80.86	4.34 (d, 6.0)	9	8, 10	118.03	5.85 (s)	3	3, 5, 8, 9, 7'
3	144.51	7.45 (s)		1, 5, C00, 7'	141.37	7.24 (s)	1	1, 4, 5, C00, 7'
4	99.04				99.80			
5	34.25	3.21 (t, 6.9)	6a, 9	3, 4, 7, 8	37.24	3.54 (t, 8.7)	6a, 6b	1, 4, 6, 9
6a	47.02	3.08-3.03 (m)	5, 6b		40.30	3.16 (m)	5, 6b, 7	5, 7, 8, 9
6b		2.96 (d, 16.0)	6a, 7	4, 7, 8, 9		2.41 (m)	5, 6a, 10	4, 5, 7, 8
7	120.12	5.10 (br s)	6b, 10	5, 6, 9	128.43	5.59 (s)	10	5, 6, 8, 9, 10
8	146.38				142.40			
9	54.94	3.09 (m)	1, 5		125.63			
10	63.06	3.90 (t, 1.8)	7	7, 8	59.15	4.05 (s)	6b, 7	7, 8, 9
C00	167.97				168.39			
O-CH <sub>3</sub>	50.11	3.51 (s)		C00	50.34	3.47 (s)		C00
Benzylamine								
1'	137.39				137.63			
2', 6'					126.92	6.86 (d, 7.3)	3', 5'	2' ~ 7'
3', 5'	128.56-127.40	7.03-6.94 (m)			128.70	6.98 (t, 7.6)	2', 4', 6'	1', 2', 3', 5', 6'
4'					127.58	6.94 (t, 7.3)	3', 5'	2', 6'
7'a	53.80	4.03 (d, 15.1)	7'b	3, 1', 2' ~ 6'	57.35	3.75 (s)	2', 6'	1, 3, 1', 2', 6'
7'b		3.69 (d, 15.1)	7'a	1, 3, 1', 2' ~ 6'				