

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
（H26-食品-一般-001）

平成28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：青色素の構造の解明～
分担研究者 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行った。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、黄色素Y1とその異性体Y1'を生成する。次に、1位のOH基と9位のプロトンが*cis*配置した異性体Y1'は、速やかに脱水し黄色素Y2となった後、青色素成分へ変化または重合していくと考えられた。昨年度は、青色素の前駆体と考えられる黄色素Y1及びY2の構造を明らかとした。本年度は引き続き、クチナシ青色素の色素生成メカニズムを明らかとするため、モデル実験下、色調変化の観察と共に青色素B1及びB2を単離し、その構造を推定した。その結果、青色素B1及びB2は、前駆体である黄色素Y1及びY2が繰り返し重合した化合物であると推定された。

研究協力者

多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

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、その主色素成分の化学構造及び色素生成メカニズムは明らかとされていない。

そこで、我々はクチナシ青色素の主色素成分の生成過程及び反応生成物の化学構造を明らかとするため、反応出発原料となるゲニピン

(genipin)とベンジルアミン(benzylamine)を用いたモデル実験を行った。モデル実験の結果、Fig. 1に示す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、黄色化合物Y1とその異性体(Y1')を生成する。次に、1位のOH基と9位のプロトンが*cis*配置したY1'は、速やかに脱水し黄色化合物Y2となり、その後、青色素成分へ変化または重合していくものと考えられた。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た(Fig.1)。すなわち、単離した黄色化合物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。

本年度は、既存添加物クチナシ青色素の主色素成分の化学構造及び青色素生成メカニズムを明らかとするため、昨年度に引き続き、モデル実験を行い、前駆物質である黄色化合物Y1及びY2より生成する青色素の化学構造を検討すると共にその生成機構について考察したの

で報告する。

B. 研究方法

B-1) 試薬等

本研究では、クチナシ青色素のモデル合成実験のため、以下の市販試薬を用いた。

ゲニピン(Wako, 078-03021, Lot: CTF5047), ベンジルアミン(Wako, 029-05273, Lot: CTP1798), 1,4-BTMSB- d_4 標準物質(Wako, 024-17031, Lot: DCL1923), MeOH- d_4 (ISOTEC, 151947, Lot: IY2101), TLC プレート: Silicagel60 F254 (MERCK, #5715, 20x20cm, 250um, 1x5cm にカットして使用), シリカゲル充填剤: シリカゲル 60 (MERCK, 1.07734.1009, 0.063-0.200mm)

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/MS, UPLC/TOF-MS 及び prepLC 装置・測定条件は Table 1~3 に示した NMR 測定には、JEOL 製 JNM-ECZ600 (JEOL CH UltraCOOL probe) を使用した。スペクトルの化学シフトはすべて native scale のまま δ 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追跡(LC による追跡)

昨年度の報告において、出発原料のゲニピンとベンジルアミンはモル比 1:1 で反応することが示された。そこで、各 0.1 mmol/20 mL (MeOH 溶液) で調製し、混合直後から青変後まで波長 600 nm における LC/PDA クロマトグラムの変化を観察した(LC 分析条件: Table 1)。別に Y1 及び Y2 画分を昨年度の方法で予め単離し、減圧乾固後、MeOH に再溶解した溶液についてその経時変化を同 LC 条件により観察した。

B-4) ゲニピンとベンジルアミンの反応追跡(NMR による追跡)

ゲニピン 0.4 mmol を、0.2 mg/mL の 1,4-BTMSB- d_4 (NMR 基準物質) /MeOH- d_4 溶液

0.6 mL に溶かし、5 mm ϕ NMR 試料管に封入し、ゲニピンのみのスペクトルを測定した。次に、ゲニピンと当モル量になるようにベンジルアミン(40 μ L)を試料管に直接添加し、混合直後からの一次元 NMR スペクトルの変化を観察した。NMR スペクトルは、 ^1H -qNMR(測定時間 7 分)と ^{13}C -NMR(測定時間 12 分)を 1 セットとし、次の条件で測定した。 ^1H -qNMR: 測定温度 = 室温, RG = 20, scan = 4 回, プロトンシグナル強度に定量性を持たせるため繰り返し時間を 64 s ($> T_1 \times 5$ 倍)とした。

^{13}C -NMR: 測定温度 = 室温, RG = 56, scan = 256 回, 定性条件下で繰り返し測定した。

B-5) 青色素成分の単離精製

ゲニピン及びベンジルアミン各 0.1 mmol を MeOH 5 mL に溶かし、封管中、80 $^\circ\text{C}$ で 5 時間反応させた。反応液に水(50 mL)を加え、HCl で弱酸性にした後、酢酸エチル(50 mL)で 3 回液-液抽出し、酢酸エチル層に溶解する青画分を得た。減圧下、酢酸エチルを留去後、少量の展開溶媒に再溶解したものを精製用の試料溶液とし、Si オープンカラム(展開溶媒: クロロホルム: MeOH = 10:1, $\phi 20$ mm \times 140 mm 充填)に付した。得られた青色素成分画分をまとめ、減圧下、溶媒を留去し、70% MeOH 溶液に再溶解し、Table 3 に示す条件の prepLC に付し、青色素成分 B1(保持時間 22 分)及び B2(保持時間 28 分)を精製した。それぞれ減圧乾固後、重溶媒に溶かし、NMR (^1H , ^{13}C , COSY, ^1H - ^{13}C -HMQC, ^1H - ^{13}C -HMBC) 及び UPLC/TOF-MS(分析条件, Table 2)測定を行い、得られたスペクトルデータより化学構造を推定した。

C. 結果及び考察

C-1) LC による Y1 及び Y2 の経時的観察

ゲニピンとベンジルアミンを混合した場合、その溶液中には黄色化合物 Y1 及び Y2 が生成し、次に溶液が青色に変化するに伴い、Y2 が減少することを昨年度報告した。このことから、黄色化合物 Y1 及び Y2 は青色素の前駆体であると考えられた。本年度は引き続き、溶液が青くなつてからの挙動を観察した。

Fig.2 には、Table 1 の LC 条件下、検出波長 600 nm で青色素成分のピークが時間の経過と共にどのように変化するか観察した結果を示した。なお、この LC 分析条件では、黄色化合物 Y1 及び Y2 は保持時間 12 分及び 14 分にそれぞれ観察される。ゲニピン及びベンジルアミン 1:1 の混液では、液色が緑色となったとき、保持時間 16.5 分付近にピークが出現し、液色が青色に変化したときには、保持時間 10~20 分の幅広いピークとともに、15~17 分付近に数本飛び出たピークが生じた。さらに時間経過させると保持時間 10~20 分にわたる幅広いピークになることが確認された(Fig. 2a)。

次に、Si オープンカラムにより精製した黄色化合物 Y1 及び Y2 画分を MeOH に再溶解し、同条件の LC に付し、液色の変化及びピークの出現を経時的に観察した (Fig. 2b, 2c)。Y1 の溶液は薄い黄色溶液であったが、時間と共に色調が変化し、薄い水色に変化した。Fig. 2b には示していないが、PDA(190-800 nm)により、保持時間 12 分に観察される Y1 のピーク面積の経時的な変化を確認したところ、ほとんど変化しなかった。一方、検出波長 600 nm のクロマトグラムでは保持時間 16 分付近に小さな幅広いピークが時間経過と共に出現した。したがって、黄色化合物 Y1 は青色素の前駆体ではあるが非常に反応速度が遅いと考えられた。一方、Y2 の溶液は橙色の溶液であったが、時間経過と共に青色に変色し、最終的に黒色に近い青色になった。別に PDA(190-800 nm)により、保持時間 14 分に観察される Y2 ピークの経時的な変化を確認したところ、完全に消失した。また、検出波長 600 nm におけるクロマトグラムの経時的な変化は、ゲニピン及びベンジルアミン 1:1 の混液の挙動と類似していた。したがって、黄色化合物 Y2 は青色素の前駆体であり、生成後、直ちに青色素成分に変化するものと考えられた。

いずれの経時的な観察においても、検出波長 600 nm のクロマトグラム上には青色素成分に由来すると考えられるピークが幅広く観察されたことから、前駆体である Y1 及び Y2 が複雑に重合することによって青色素成分に変化し

ていると考えられた。

C-2) NMR による Y1 及び Y2 の経時的観察

C-1)で示したとおり、Y1 及び Y2 は青色素成分の前駆物質であることは明らかである。そこで、その化学構造の変化を追跡するために NMR 測定を行った。予めゲニピンのみを MeOH- d_4 に溶解し、 ^1H -qNMR 及び ^{13}C -NMR 測定した後、当モル量のベンジルアミンを添加し、混合直後からの経時変化を観察した。なお、生成物の濃度変化がわかるように内標 (1,4-BTMSB- d_4) を添加し、 ^1H -qNMR と ^{13}C -NMR を 1 セットとして繰り返し測定を行った(Fig. 3, 4)。その結果、時間の経過と共に NMR 試験液は赤褐色に変化し、ゲニピン由来のシグナルは消失し、Y2 由来のシグナルと考えられるものと共に非常に小さなシグナルが観察されるのみであった。Fig. 3, 4 には反応開始後 20 分までの NMR スペクトルを示したが、更に 1.8 ヶ月後に測定してもスペクトルパターンに変化はなく、内標 (1,4-BTMSB- d_4) に対するシグナル強度が低下しただけであった。この反応液の NMR 試験管を傾けると溶液は赤褐色であるが、ガラス壁面が青色に着色していたことから、沈殿あるいはガラス面への吸着のために、NMR 試験液中に青色素成分はほとんど溶解して存在しておらず、NMR 測定によりシグナルとして観察できなかったと考えられた。この NMR 測定の結果と C-1)の LC 分析の結果を合わせて考えると、生成する青色素成分は溶解度が非常に低く、また、分子サイズの大きい複雑な重合物であることが推測された。

C-3) 青色素 B1 及び B2 の化学構造

Fig. 2 に示したとおり、ゲニピン及びベンジルアミンを当モル量反応させた溶液を LC 分析したとき、保持時間 10~20 分付近に青色素成分に由来する幅広いピークが観察される。この幅広いピークには、鋭いピークがいくつか含まれており、更に反応を継続するとこの鋭いピークは徐々に小さくなる。したがって、この鋭いピークはある程度重合したものでそれ以降重合反応が進みにくくなった化合物であると推

定した。そこで、このピークに由来する青色色素成分の単離を試みた。

ゲニピン及びベンジルアミンの反応液を水で希釈し、HCl 酸性にして酢酸エチルで液-液抽出したところ、酢酸エチル層に溶解する青色色素画分が得られた。この画分を Si オープンカラムに付して更に精製した後、Table 3 に示す条件の prepLC に付し、青色色素成分 B1 及び B2 を得た。得られた青色色素成分 B1 及び B2 を Table 1 に示す条件の LC/MS に付し、その精製度を確認した (Fig. 5)。その結果、青色色素成分 B1 は保持時間 16.0 分にシャープなピークを与え、極大吸収波長 604.9 nm、ESI positive モードにおいて m/z 541.2 のイオンを与えるものであった。また、青色色素成分 B2 は保持時間 16.4 分にシャープなピークを与え、極大吸収波長 617.9 nm、ESI positive モードにおいて m/z 555.2 のイオンを与えるものであった。更に、青色色素成分 B1 及び B2 について、Table 2 に示す条件で UPLC/TOF-MS により精密質量を測定したところ、ESI positive モードにおいて、B1 が m/z 541.2119、B2 が m/z 555.2299 を与え、B1 に由来する positive イオンの組成式が $C_{35}H_{29}N_2O_4$ (calcd. m/z 541.2127)、B2 に由来する positive イオンの組成式が $C_{36}H_{31}N_2O_4$ (calcd. m/z 555.2284) と推定された。前駆物質 Y2 の組成式 $C_{18}H_{19}NO_3$ と比較すると、B1 が $(Y_2+Y_2)-CH_{10}O_2$ 、B2 が $(Y_2+Y_2)-H_8O_2$ に相当し、いずれも Y2 が 2 分子脱水結合し、更に共役二重結合を形成した化合物であると推定された。

次に、B1 及び B2 を $MeOH-d_4$ に溶解し 1H -NMR を測定したところ、ベンジル基に由来するシグナルが δ 7.4 ppm 及び δ 5.7 ppm 付近に、メチルエステル基に由来するシグナルが δ 3.9 ppm 付近に観察されたが、いずれも Y2 の 5, 6 位のシグナルが消失し、更に 1, 3, 7, 10 位のシグナルが δ 7~9 ppm に低磁場シフトしていると考えられるスペクトルを示した (Fig. 6, 7, Table 4)。また、 ^{13}C -NMR では、ベンジル基に由来するシグナルが δ 128~135 ppm 及び δ 63 ppm 付近に、メチルエステル基に由来するシグナルが δ 52 ppm 及び 164 ppm 付近に観察されたが、いずれも Y2 の 5, 6 位のシグナルが消失し、低磁場領

域にシフトしていると考えられるスペクトルを示した。次に、B1 について HMQC 及び HMBC 測定を行い、その相関より化学構造を推定したところ、Fig. 8 に示すような部分構造が推定された。このように B1 は 2 つの Y2 が 6 位と 10 位で脱水縮合後、更に酸化され水素が脱離し、共役二重結合が生成し、共役系が延長された構造をとっていると考えられた。この推定部分構造では 2 位の N 基の電子が化合物全体に非局在化するため、深色化し青色を示す可能性が高く、B1 の部分構造として妥当であると考えられる。また、UPLC/TOF-MS により B1 は m/z 541.2119 を与え、 $C_{35}H_{29}N_2O_4$ の positive イオンの組成式が推定され、この結果は B1 の部分構造のイオンに由来すると思われる。更に B1 の NMR スペクトルが単純であることから、同じ立体配座の繰り返し構造をとっていると考えられる。一方、B2 は B1 に比べて複雑なスペクトルパターンを示すことから、B1 とは部分的に立体配座が異なる異性体であると推定される。

Fig. 9 にモデル実験により得られた結果より、青色色素成分の生成機構をまとめた。すなわち、前駆体 Y2 より中間体モノマー M2 及び M3 が生成した後、M2 と M3 が重合を繰り返し、B1 や B2 のような重合体が形成されることが考えられる。重合を繰り返すことによって分子量は大きくなり溶解性は低下すると思われることから、最終的にはある一定の範囲の重合度で反応が停止すると思われる。

D. 結論

既存添加物クチナシ青色色素は、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行った。昨年度は、青色色素の前駆体と考えられる黄色素 Y1 及び Y2 の構造を明らかとした。本年度は引き続き、クチナシ青色色素の色素生成メカニズムを明らかとするため、モデル実験下、色調変化の観察と共に青色色素 B1 及び B2 を単離し、その構造を推定した。その結果、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，黄色素 Y1 とその異性体 Y1' が生成し．次に，1 位の OH 基と 9 位のプロトンが *cis* 配置した異性体 Y1' は，速やかに脱水し黄色素 Y2 となった後，青色素成分へ変化または重合していくと考えられた．生成した青色素成分の混合物より青色素 B1 及び B2 を精製し，その化学構造を LC/TOF-MS 及び NMR により解析した結果，Y2 の 6 位と 10 位が脱水結合して共役二重結合を形成し，更に繰り返し結合した重合物であると推定された．

E. 参考文献

なし

F. 研究業績

1. 学会発表

- 1) 石附京子，西崎雄三，多田敦子，箕川剛，中島光一，穂山浩，杉本直樹，佐藤恭子：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：前駆体の構造決定．食品化学学会(2016.6)．
- 2) 杉本直樹：qNMR による相対感度係数の算出とその有効利用について．JAIAN (2016.8)．
- 3) 杉本直樹：定量 NMR/LC を用いた天然有機化合物の定量分析法の開発(シンポジウム I 「定量 NMR から見えてくる世界」)．日本生薬学会第 63 回年会 (2016.9)．
- 4) 黒江美穂，山崎太一，斎藤直樹，中村哲枝，沼田雅彦，西崎雄三，杉本直樹，井原俊英：新規定量法である qNMR/LC 法による非イオン界面活性剤標準液の濃度評価．日本分析化学会第 65 回年会(2016.9)．
- 5) 斎藤直樹，北牧祐子，大塚聡子，西崎雄三，杉本直樹，井原俊英：定量 NMR における不純物の重なる信号に対するクロマトグラフィーを併用した新規評価法の確立．NMR 討論会 (2016.11)．
- 6) 藤原裕未，田中理恵，杉本直樹，西崎雄三，穂山浩，永津明人：定量 NMR を利用した生薬成分の定量．第 45 回生薬分析シンポジウム(2016.11)．

G. 知的財産権の出願．登録状況

なし

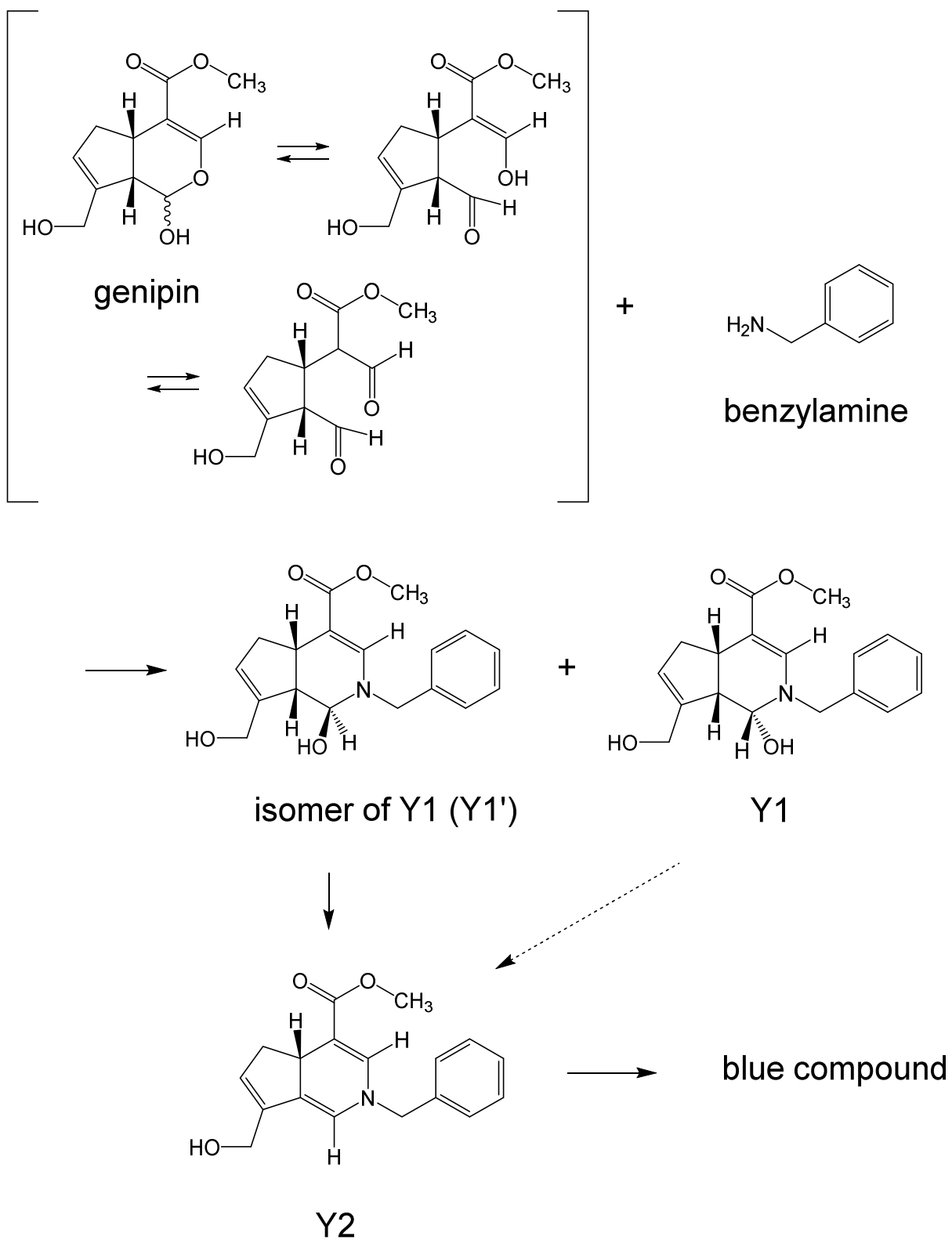


Fig. 1 Estimated reaction pathway of blue compound generation from genipin and benzylamine

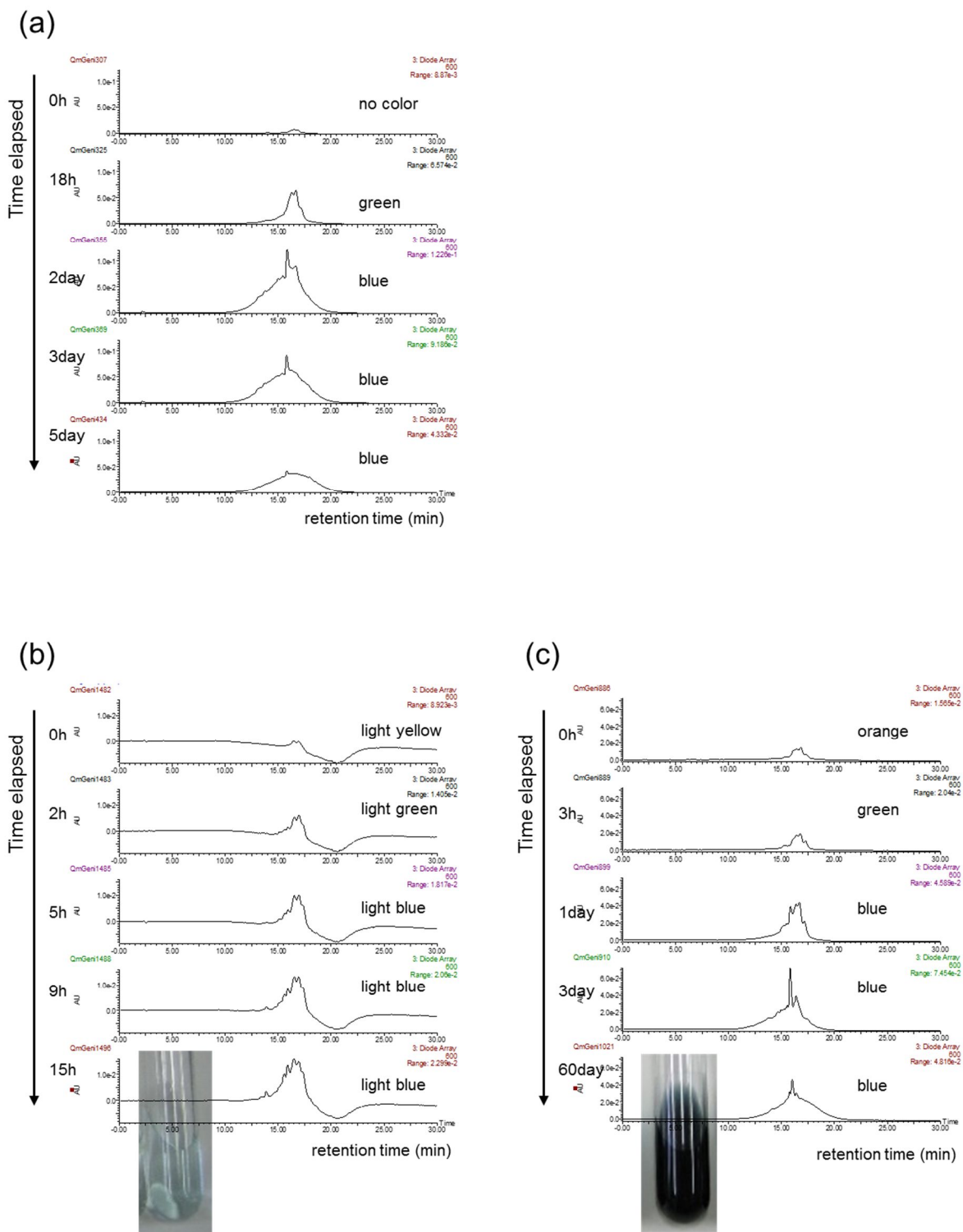


Fig. 2 Changes of LC profiles of reaction mixture (genipin : benzylamine = 1 : 1) and fractionated solutions of compound Y1 and Y2

The LC profiles were recorded on LC conditions shown in Table 1. a) Reaction mixture (genipin : benzylamine = 1 : 1). b) Fractionated solution of Y1. c) Fractionated solution of Y2.

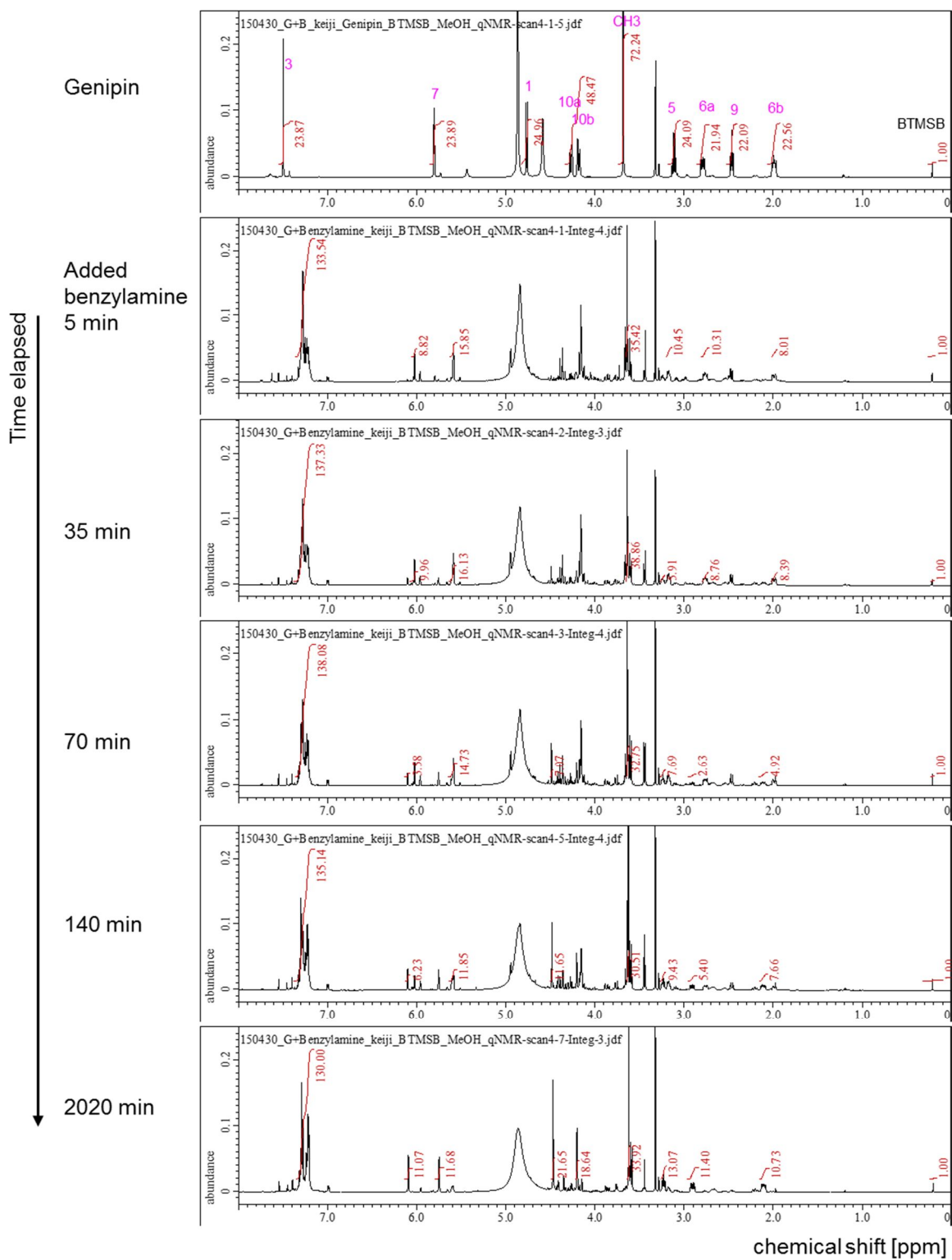


Fig. 3 Changes of ¹H-NMR profiles of reaction mixture (genipin : benzylamine = 1 : 1)

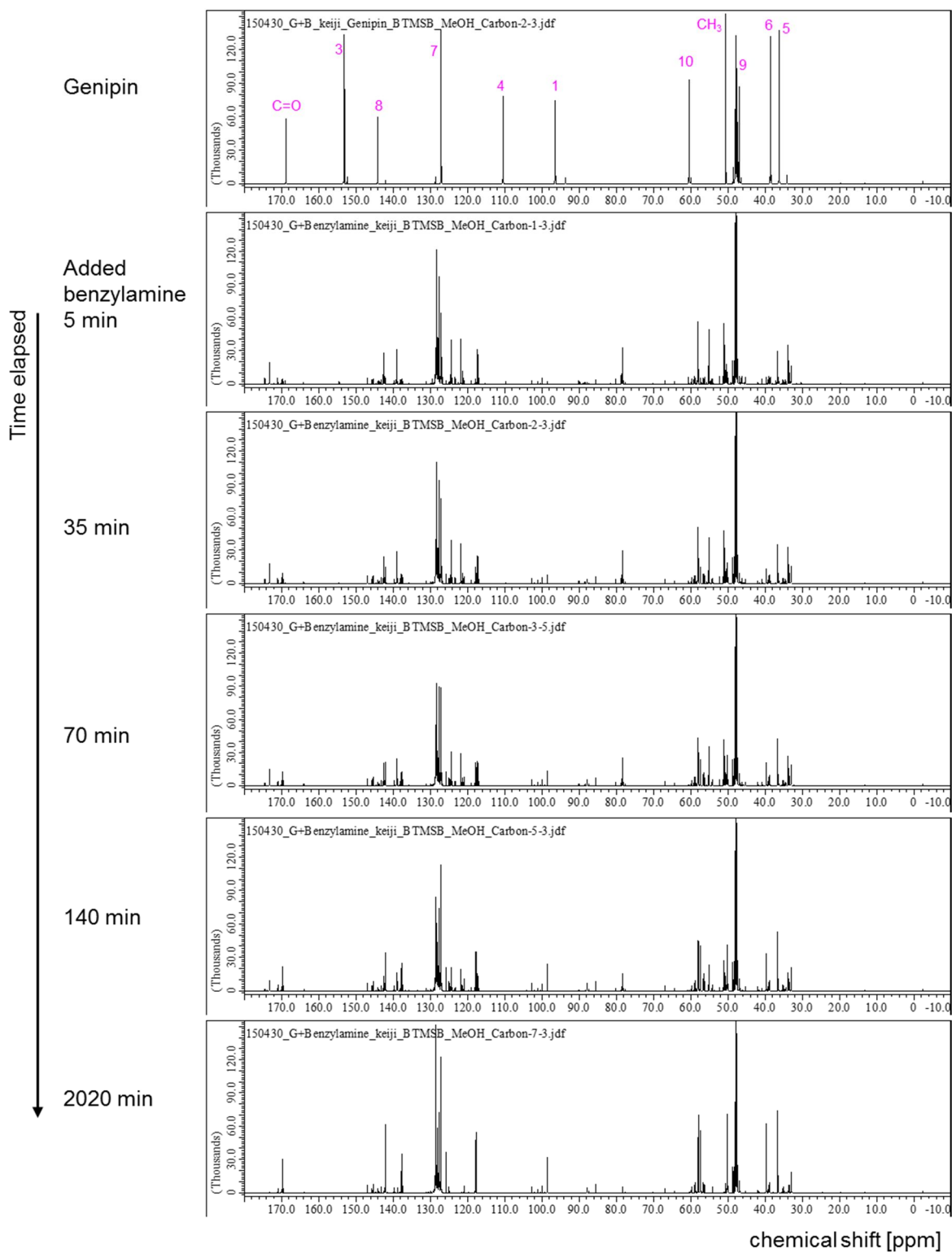


Fig. 4 Changes of ^{13}C -NMR profiles of reaction mixture (genipin : benzylamine = 1 : 1)

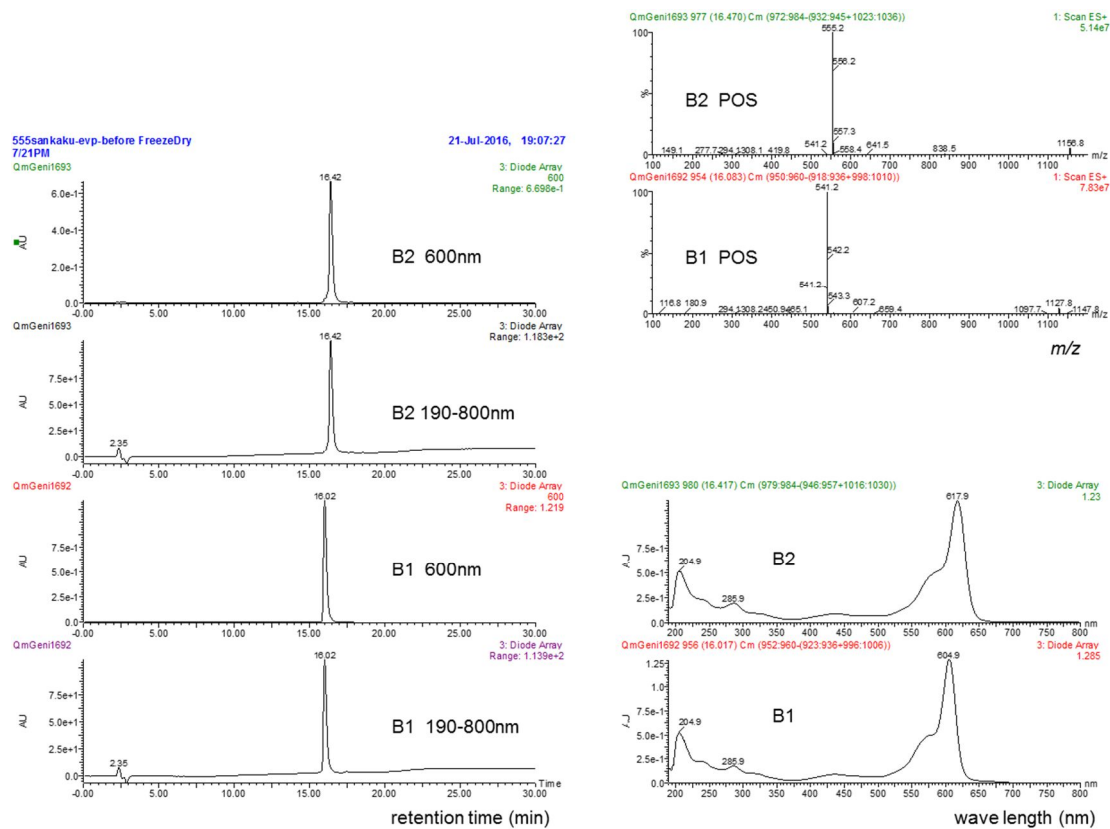


Fig. 5 HPLC profiles of purified fractions, and mass and UV spectra of peak B1 and B2

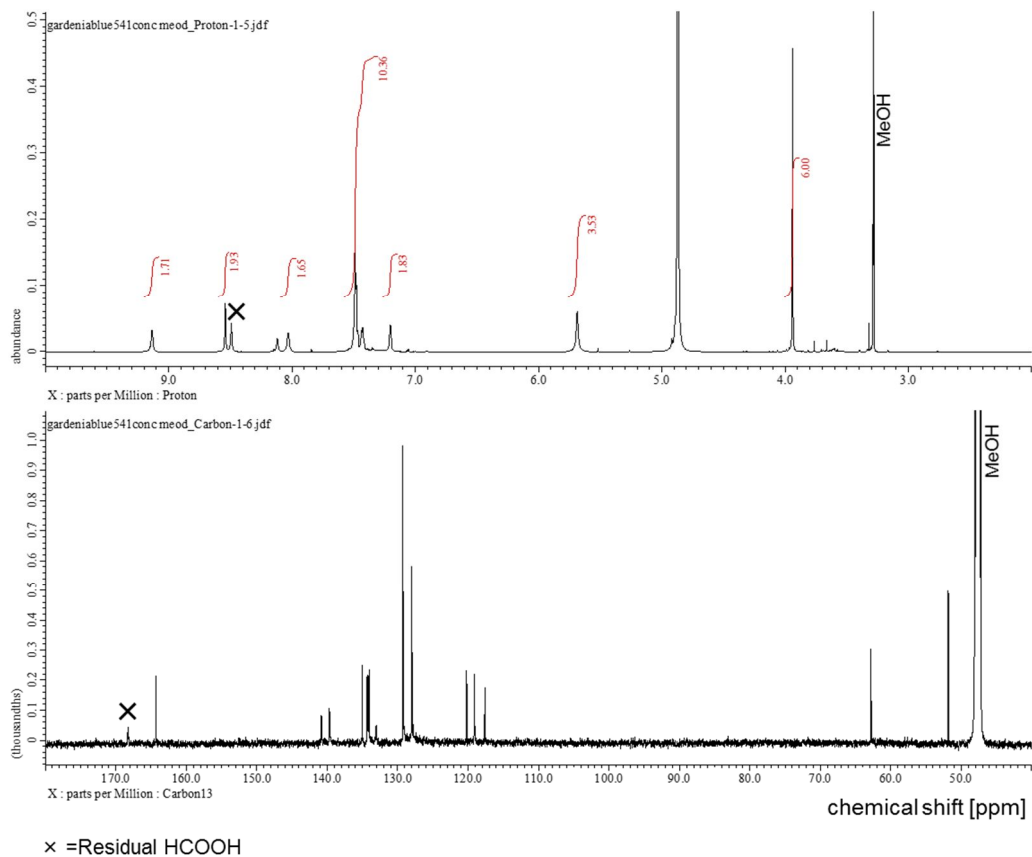


Fig. 6 NMR spectra of B1 in MeOH- d_4

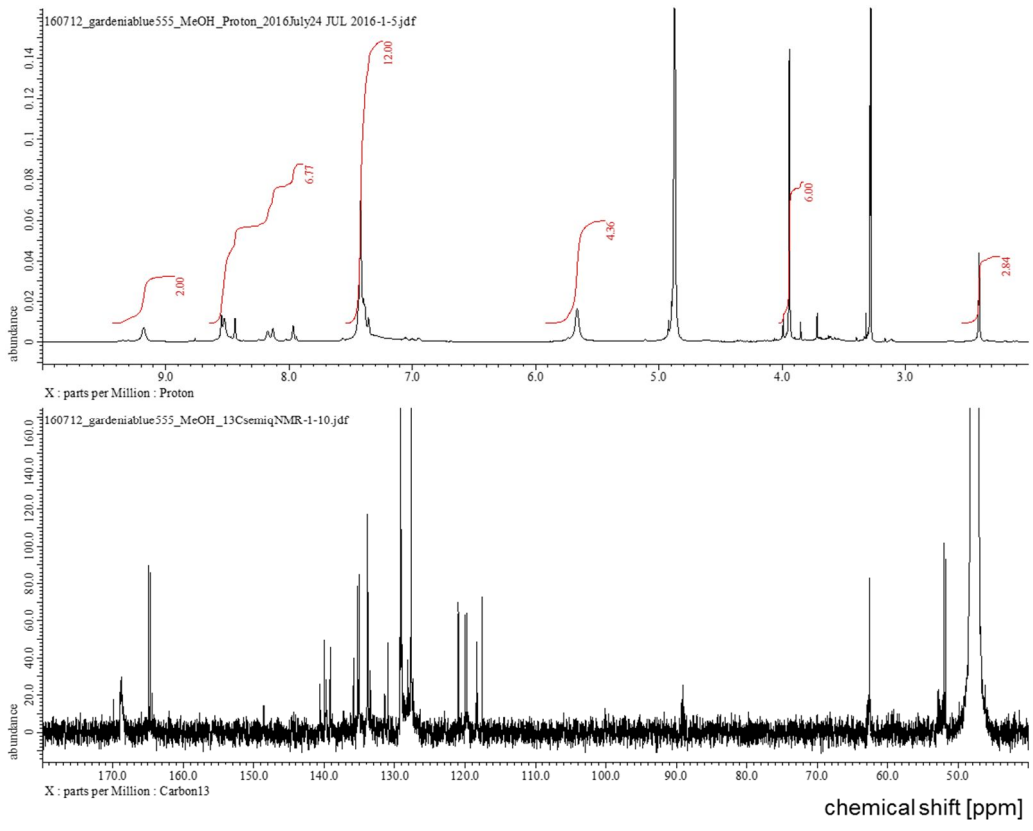


Fig. 7 NMR spectra of B2 in MeOH-*d*₄

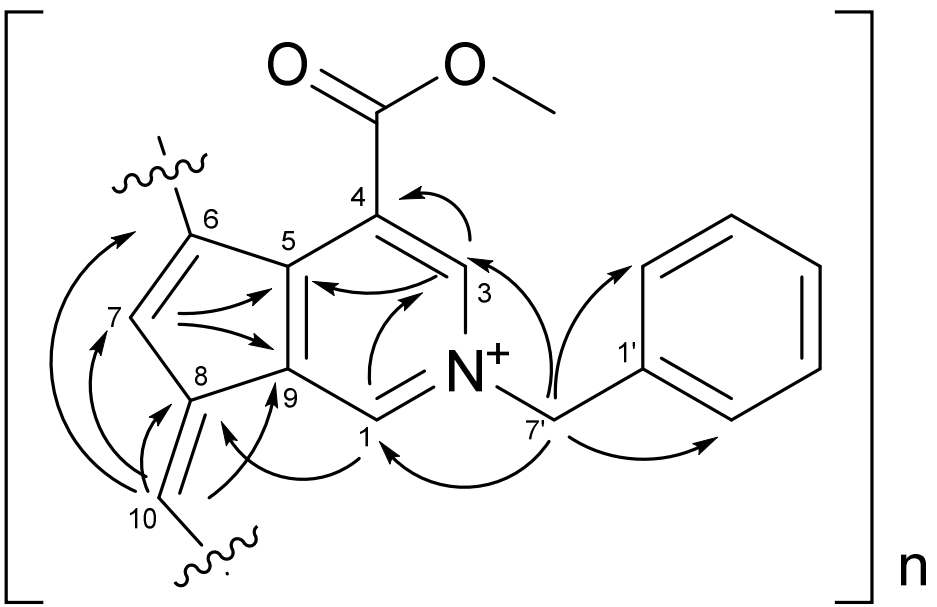


Fig. 8 Estimated segment structure of B1

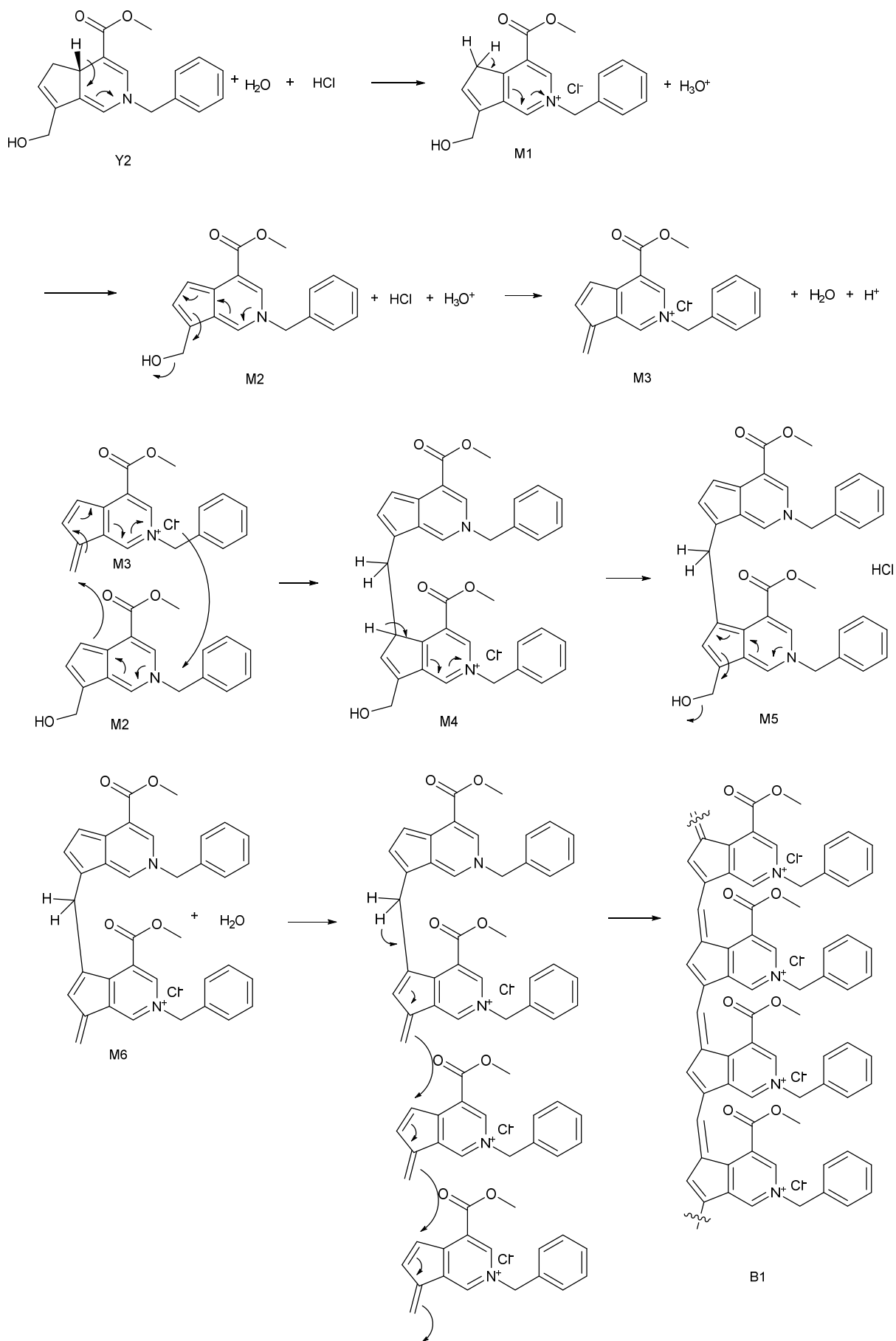


Fig. 9 Estimated reaction pathway of blue compound generation from Y2

Table 1 LC/MS conditions

LC/MS system	Waters LC : Alliance 2695 , PDA : 2996 photodiode array detector, MS : Quattro micro™
Column	Atlantis T3 (2.1 × 150 mm , 3 μm , Waters)
Column temp.	40
Solvent	A : 0.1% HCOOH/H ₂ O B : 0.1% HCOOH/MeOH gradient: B 50% (0-3 min) 95% (15-25 min)
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
Desolvation temp.	350
Desolvation gas flow	400 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Ion mode	ESI
MS scan	m/z 100-1000

Table 2 UPLC/TOF-MS conditions

LC/MS system	Waters UPLC : ACQUITY H-CLASS , PDA : ACQUITY e , TOF-MS : Xevo-G2 QToF
Column	ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm , 1.7 μm , Waters)
Column temp.	40
Solvent	A : 0.1% HCOOH/H ₂ O B : 0.1% HCOOH/MeOH gradient: B 50% (0 min) 95% (9-11 min)
Flow rate	0.2 mL/min
PDA scan	210-800 nm
Capillary voltage	0.5 ~ 4.0 kV
Cone voltage	10 ~ 100 V
Source temp.	120
Desolvation temp.	450
Desolvation gas flow	800 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Ion mode	ESI (Resolution mode)
MS scan	m/z 100-4000

Table 3 Prep LC conditions for compound B1 and B2

LC system	SHIMADZU : prominence LC (LC -20AT , SIL-20AC , CTO -20AC) , PDA (SPD -M 20A) , FRACTION COLLECTOR (FRC -10A)
Column	Atlantis Prep T3 (10 × 250 mm , 5 μm , Waters)
Column temp.	40
Solvent	A : 0.1% HCOOH / H ₂ O B : 0.1% HCOOH / MeOH isocratic : B 66%
Flow rate	2.5 mL / min
PDA scan	190-800 nm (detect : 600 nm)
Injection volume	200 ~ 800 uL

Table 4 ¹H- and ¹³C-NMR assignments of B1

Position	¹³ C	¹ H		HMBC (H→C)
		DEPT135		
1	134.1 *	CH	9.14 brs	3, 5, 8, 7'
3	134.3	CH	8.54 brs	1, 4, 5, 7', C=O
4	117.6	C		
5	140.8	C		
6	120.2	C		
7	139.7	CH	8.03 brs	5, 6, 8, 9, 10
8	134.1 *	C		
9	134.2	C		
10	119.1	CH	7.2 brs	6, 7, 9
C=O	164.3	C		
MeO	51.8	CH ₃	3.94 s	C=O
1'	135.0	C		
2', 6'	128.0	CH	7.43-7.49 m	1', 2', 3', 4', 5', 6', 7'
4'	129.2	CH		
3', 5'	129.3	CH		
7'	62.8	CH ₂	5.69 brs	1, 3, 2'

* overlapped signal