

Pseudoazulene 骨格を有する天然由来青色色素について

井上謙一郎^{a)}

岐薬紀要 (1993) 42 : 1-14

要約： *Genipa americana* の果実のイリドイド成分である genipin は酸素存在下アミノ酸と容易に反応し青色色素を生成する。この色素は食用色素として利用されているが、高分子混合物でその構造は明らかにされていない。この青色色素の構造解析と生成機構解明のための基礎研究として、酸素遮断下 genipin を methylamine と反応させたところ、9種の赤褐色物質を与えた。さらに酸素存在下で反応を継続すると青色色素を生成した。ここでは、まずこれら赤褐色物質の構造と分光学的特性について述べ、次にこれらの生成機構について考察した。

索引用語： 青色色素, イリドイド, genipin, geniposide, アミノ酸, メチルアミン, pseudoazulene, 2*H*-pyrindine, 核磁気共鳴スペクトル

Blue Pseudoazulene-Skeleton Pigments of Natural Origin

KENICHIRO INOUE^{a)}

Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ. (1993) 42 : 1-14

Abstract : Genipin, an iridoid constituent of *Genipa americana*, readily reacts with amino acids in the presence of oxygen to give a mixture of polymeric blue pigments whose structures are not determined. In the basic studies to elucidate the structure and formation mechanism of blue pigments, the reaction of genipin with methylamine in the absence of oxygen yielded 9 red compounds leading to blue pigments.

In this article, the structures and spectroscopic properties of these red compounds were described. The formation mechanism also was discussed.

Keyphrases : blue pigment ; iridoid ; genipin ; geniposide ; amino acid ; methylamine ; pseudoazulene ; 2*H*-pyrindine ; NMR

はじめに

近年我が国の急速な経済発展のお蔭で我々の生活にもゆとりができた。このことが食生活にも反映され食卓の上も色彩豊かになってきた。山梔子（クチナシの果実）が栗の甘露煮に、小豆が赤飯に利用されるように、天然色素は古くより食品に使用されてきたが、食品の素材に由来する色素はともかく食品に添加される食用色素の安全性は充分と

a) 岐阜薬科大学生薬学教室

岐阜市三田洞東5丁目6-1

a) Laboratory of Pharmacognosy,

Gifu Pharmaceutical University,

6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 28, 1993

The Annual Proceedings of Gifu

Pharmaceutical University,

ISSN 0434-0094, CODEN : GYDYA 9

はいい難く、近年種々の分野で自然指向が高まる中で食用色素においても天然指向が高まっている。天然色素には植物や微生物から抽出したものと天然由来の色素前駆物質を酵素処理する過程で色素を形成するものなどがある。前者に属する色素のうち、天然より高収率で得られるものは別にして、アントシアニンのような天然の原料から十分な供給が得られなかったりあるいは生産量や品質が自然条件に左右されやすい色素は近年注目を集めている組織培養技術を応用しようという検討が行われている。しかし解決すべき問題が多々残っており生産段階には到っていない。一方、後者に属するものとしては、クチナシ青色色素¹⁾が知られている。本色素は既に市販されているが、その化学的な面は全くと言ってよい程知られていない。我々は以前よりこの問題に興味をもち、本色素の基礎化学的研究を行ってきたが未だ解明するには至っていない。そこで現在までに得られた知見を纏め、今後の研究の展開に役立てたいと考え、本稿でこのクチナシ色素の化学の一端を紹介する。

クチナシ青色色素

中南米産のアカネ科植物である *Genipa americana* L. (アカネ科) の果実は古来より原住民により食用に供されてきており、またその果汁は皮膚に触れると青紫色を呈することが知られていた。1960年に Djerassiらは同植物の果実からイリドイド化合物 genipin (1) を単離し、その構造を明らかにした²⁾。その過程で genipin (1) が glycine, leucine, glutamic acid 等のアミノ酸と容易に反応して青色色素を生成することを報告している³⁾。

一方、同科に属するクチナシ (*Gardenia jasminoides* Ellis forma *grandiflora* (Lour.) Makino) の果実からは genipin (1) の配糖体 geniposide (2) を始め9種のイリドイド配糖体が単離されている⁴⁻¹⁰⁾。geniposide (2) の β -glucosidase による加水分解の過程で、反応液が次第に青変することが観察された。このことは、上述の Djerassiらの報告を考慮すると、生成した genipin (1) が酵素のアミノ酸残基と反応した結果であると説明できる。種々のアミノ酸の存在下でこの加水分解反応を行って調製した色素はクチナシ青色色素と呼ばれている¹⁾。このような青色色素はその生成過程から考えて天然色素の範疇に入るものと考えることができ、且つ原料としての geniposide (2) も安価に入手できることもあって、食用色素として大いに期待できる。事実、この青色色素は既にその製造法が確立され^{11,12)}、さらにその安全性も証明され^{1,13)}、食用色素として利用されている。しかしながら、その構造、生成機構等化学的な面は未だ解明されていない。我々はこの問題を解決すべく研究を開始した。しかしこの研究の過程で青色色素が高分子物質で且つ種々の分子量を持つ極性の強い混合物であることがわかり、青色色素そのものの構造あるいは反応性を直接明らかにすることは困難であると考えられた。

そこで、クチナシ青色色素の生成条件を再検討した。genipin (1) は Fig. 1 に示したように、発色団 MeOOC-C=C- と共役したヘミアセタール構造とジアルデヒド構造との平衡が考えられる。実際には平衡は大部分前者の方に片寄っているが、この平衡から考えると色素生成にはアミノ酸のアミノ基が関与していることが推理できる。そこでアンモニアをはじめ26種の含窒素化合物についてアミンの種類による生成色素の色調への影響を調べた。その結果、青色色素の生成には一級アミノ基が必要であることがわかった。一方、上述の酵素反応は好氣的条件で行われるので、色

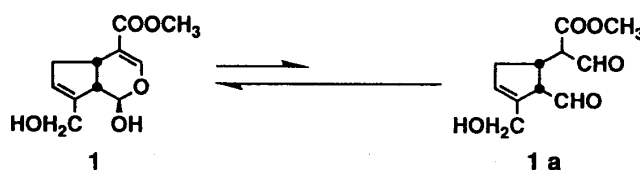


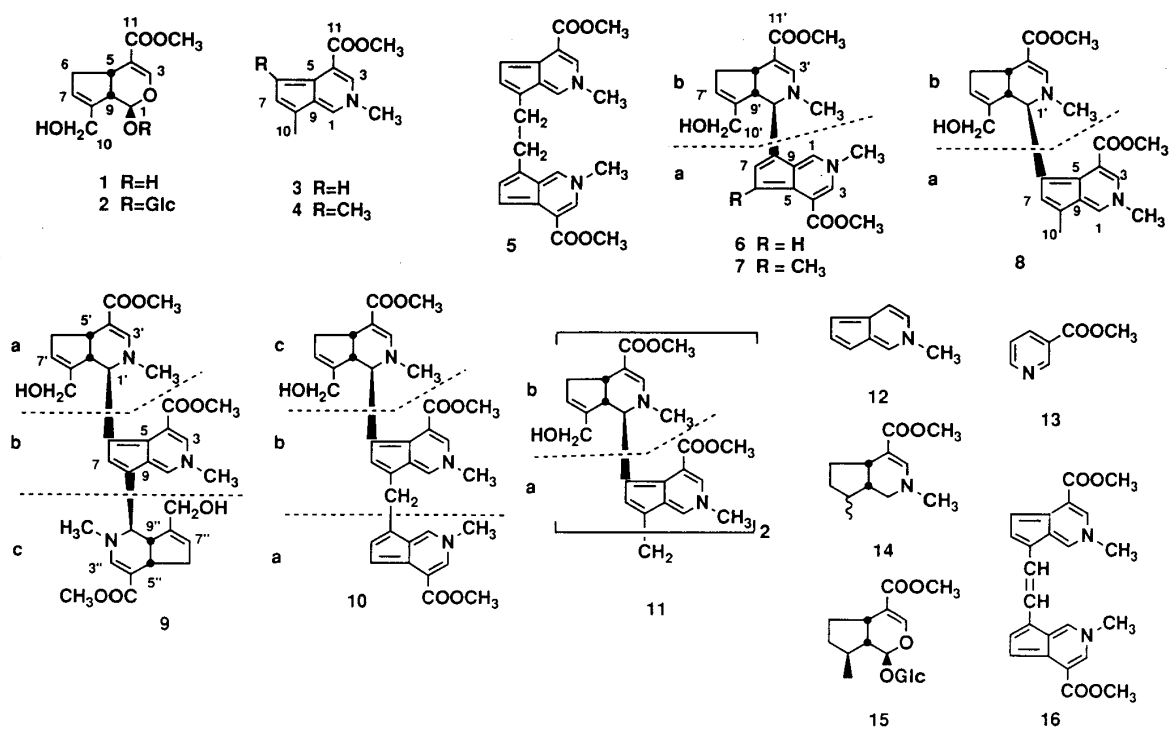
Fig. 1

素生成には酸素の関与が考えられる。このことは、桑野らの報告からも示唆される。即ち、山梔子の瀉下作用は、山梔子の主成分である geniposide (2) がマウスの腸、特に盲腸および結腸内で加水分解され、genipin (1) が生成し、それが盲腸を収縮させ、それ以降の腸管内輸送を促進することによるものと報告し、この動物実験の際に、腸管壁に曝すと管壁が青変することも報告している¹⁴⁾。このことは腸管内あるいはその壁上のタンパク質中のアミノ酸または遊離のアミノ酸と genipin (1) とが嫌気下で反応し一旦反応中間体が生成し、次いで酸素存在下で青変したかあるいはアミノ酸と genipin (1) とが酸素存在下で直接反応し青色色素が生成したものと説明される。いずれにしろ青色色素の生成には酸素が関与していることが推理できる。そこでこの反応への酸素の関与を確認するために、不活性ガス下で genipin (1) とアミノ酸を反応させたところ、反応溶液は青変せず赤褐色に着色した。しかし、続いて酸素を通導すると溶液は青変した。従って青色色素生成には酸素が必須であることが判明した。

上述の結果を踏まえ、青色色素生成のための反応系を簡略にするために、一級アミンとして最も簡単なアミンである methylamine を用い、このアミンと 1 とを酸素存在下で反応させた。得られた青色色素の分子量を膜浸透圧法により算出したところ、平均分子量が約9000の高分子混合物であることが判明した¹³⁾。しかしこの場合も精製が困難であることよりそれらの構造式を直接解明することは困難であると考えられた。そこで、不活性ガス下で同様の反応を行い、その際生成する赤褐色物質は青色色素へ至る反応中間体と考えられるので、この赤褐色物質の構造と生成機構を解明することとした。

青色色素に至る赤褐色の反応中間体の生成条件

赤褐色物質は次の条件で調製された：genipin (1) (2 mmol) と methylamine・HCl (6 mmol) を McIlvaine 緩衝液 (pH 7.2) とエタノールの等量混合液 (40 ml) に溶かし、不活性ガス下室温で2時間攪拌しながら反応させた。ここに得られた生成混合物は各種クロマトグラフィーの併用により精製され、9種の赤褐色物質 A-I (3-11) が得ら



Formulae (1)

れた。その他、反応は加熱下であるいは高圧水銀灯照射下でも行われたが、生成物には本質的な違いはなく、ただ生成比が異なっているだけであった。

赤褐色の反応中間体の構造

上述の9種の赤褐色物質は今までに天然からもまた合成的にも得られていない pseudoazulene の一種 2*H*-pyrindine 骨格を有する新しいタイプの色素ある。genipin (1) 由来の炭素骨格を1単位とすると、色素 A (3) と B (4) は単量体, C (5), D (6), E (7), F (8) は二量体, G (9) と H (10) は三量体, H (11) は四量体である。これらはスペクトル的にも興味ある化合物であるので、それらの構造推定の過程を詳細に述べたいが、紙数の関係で単量体 A (3) と二量体 (5) について述べることにする。

色素 A (3) は mp 148-149.5 °C の赤色結晶として得られた。その高分解能電子衝撃マス (HREIMS) スペクトルより本物質の分子式は $C_{12}H_{13}NO_2$ であると考えられた。本物質の紫外線吸収 (UV) スペクトルは 282 nm ($\log \epsilon$ 4.33) に極大吸収を示し、これは色素 A (3) が 2*H*-pyrindine (12)¹⁵⁾ あるいは 3-methoxycarbonylpyridine (13)¹⁶⁾ 骨格を有していることを示唆している。またその赤外線吸収 (IR) スペクトルは 1710 および 1630 cm^{-1} にエステルと芳香環の吸収バンドを示している。さらにその炭素-13 核磁気共鳴 (^{13}C -NMR) スペクトル (Table 2) において C-Me, N-Me, O-Me, C=O の各グループの炭素に由来する 4 本のシグナルの他に、1 個の水素をもつ 4 個の sp^2 炭素と水素をもたない 4 個の sp^2 炭素のシグナルが観測されるのみで、 sp^3 炭素は検出されなかった。これらのスペクトルデータから色素 A は genipin (1) と methylamine に由来する炭素をすべて有する 2*H*-pyrindine 骨格をもつものと推定された。一方、3 のプロトン核磁気共鳴 (1H -NMR) スペクトル (Table 1) において、genipin (1) の sp^3 炭素に付いた水素 (H-1, H-5, H₂-6, H-9, H₂-10) のシグナルはすべて消失し、 δ 3.95 (s) と 3.97 (s) に N-methyl 基と carbonylmethoxy 基に帰属されるシグナルのほか、Fig. 2 に示したような配列のプロトンシグナルが観察された。これらの配列は decoupling 実験により確認された。さらに NOE 実験において、vinyl methyl 基 [δ 2.47 (d)] と δ 7.76 (m) および δ 7.14 (dq) の 2 個の vinyl proton の間に、さらに N-methyl 基と δ 7.73 (d) および δ 7.76 (m) の 2 個の vinyl proton の間に各々 10%, 5%, 11%, 15% の NOE が観測された。以上のスペクトルデータと、本物質が 2*H*-pyrindine (12) 骨格を有していることを考え合わせると色素 A に対して 3 の構造が推定される。この推定は ^{13}C -NMR スペクトルデータ (詳細は後述する) 並びに 3 の還元体 (14) の生成により支持された。即ち、3 を白金触媒で接触還元したところ、14 が得られた。本物質の MS スペクトルが m/z 209 に分子イオンを示すことより、その分子式は $C_{12}H_{19}NO_2$ であり、従って 14 は色素 A (3) の hexahydro 体であることが推定された。14 の UV (λ_{MAX} : 292 nm) および IR スペクトル (ν_{MAX} : 1670 and 1605 cm^{-1}) は未だ $-(CH_3)N-CH=C-COOCH_3$ 発色団の存在を示

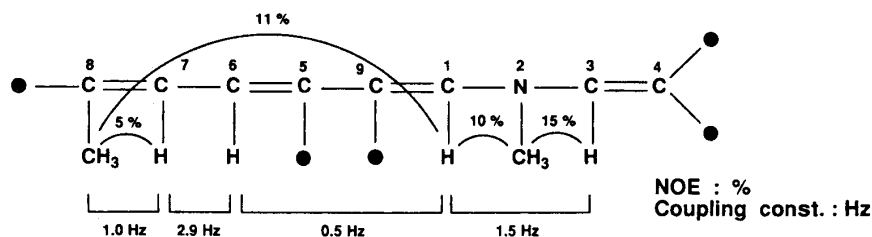


Fig. 2

している¹⁷⁾。その上、本物質の ¹H-NMR スペクトルはこの発色団に含まれる vinyl proton, carbomethoxy 基および N-methyl 基 (各々 δ 7.32 (br. s), 3.67 (3H, s) および 2.94 (3H, s)) の存在¹⁷⁾ のみならず, 1.06 (3H, d, J = 6.5 Hz) に -CH-CH₃ 基の存在も示している。その他, deoxyloganin (15)¹⁸⁾ の cyclopentane 環に由来するシグナルパターンに類似したシグナルが δ 1.00-3.00 付近に観測される。これら一連のデータはこの還元体が14の構造をもつことを示すものであり, 引いては色素 A に対し 3 の構造を支持するものである。従って, 色素 A は 3 の構造をもつことが推定された。

色素 C (5) は C₂₄H₂₄N₂O₄ の分子式をもつ赤色非晶物質として得られた。本物質の ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトル (Table 1 and 2) は色素 A (3) の場合と類似しているが, ただ色素 A (3) の10位のメチル基のシグナルが消失し, 新たに δ 4.51 (2H, br. s) と δ 26.79 (t) に各々アリル位のメチレンのプロトンと炭素のシグナルが現れている点で異なっている。しかしながら, その NMR スペクトルにおいてプロトンおよび炭素の数が分子式中の数の半分しか観測されない。また, マス (MS) スペクトルにおいて, 分子イオン (m/z 404) の半分のマスユニットをもつフラグメントイオン (m/z 202) が強く現れている。これらの事実に基づき, 色素 C に対し 5 のような対称構造を推定した。この構造は, 色素 C (5) をエタノール-McIlvaine 緩衝液に溶かし酸素を通導すると, 青色色素16が生成することより支持される。16は酸素ラディカルにより水素ラディカルが引き抜かれて生成したものと考えられる。

単量体 A (3) と二量体 C (5) を除く他の赤褐色色素の構造は, 各種スペクトルにおいて, これら二種の化合物のそれらと比較することにより推定した。特に, このような類似した構造を単位とする oligomer の構造決定には ¹³C-NMR とマスペクトルが有用な手段である。

色素 A-I の ¹³C-NMR スペクトル

上述したように, 青色色素は上記の赤褐色の色素を経て生成し, 且つ基本骨格として 2H-pyrindine を含む oligomer あるいは polymer と考えられる。そこで, 青色色素の構造解析には ¹H-NMR スペクトルよりも ¹³C-NMR スペクトルの方が有用な手段と考えられるので, 色素 A-I (3-11) の ¹³C-NMR データの特徴を下記にまとめた。

色素 A-I (3-11) の ¹³C-NMR スペクトルにおいて, 各炭素の帰属は次のようにして行った。まず, 色素 A (3), B (4), D (6) において, 2H-pyrindine 部分の, プロトンをもつ炭素は selective proton decoupling (SPD) 法により帰属した。またプロトンをもたない炭素は long range selective proton decoupling (LSPD) 法および azulene とその誘導体の ¹³C-NMR スペクトルを参照することにより帰属した。tetrahydro-2H-pyrindine 部分の各炭素は genipin (1) の各炭素の化学シフト値との比較および SPD 法により帰属した。他の色素における各炭素の帰属は上記の色素の ¹³C-NMR スペクトルとの比較により行った。さらに 2H-pyrindine およびその還元体の C-1, C-3, C-4, N-CH₃ の帰属は, genipin (1) と [¹⁵N]-methylamine とより生成した ¹⁵N 標識色素 B (4), D (6), E (7), G (9) の ¹³C-NMR スペクトルにおいて観察された ¹⁵N-¹³C coupling により確認された。上記の方法により帰属された9種の色素の ¹³C-NMR データを Table 2 に示した。

- 1) 2H-pyrindine において, C-1 は C-3 よりも常に低磁場に現われる。また両炭素は各々の結合定数 J_{C-H} (C-1; ca 181 Hz, C-3; ca 175 Hz) により識別できる。
- 2) carbomethoxy 基の methyl 基のシグナルは, 2H-pyrindine においては δ 51.62-52.35 の間に, 一方 tetrahydro-2H-pyrindine においては δ 50.16-50.57 の間に現れる。
- 3) N-methyl 基のシグナルは, 2H-pyrindine においては δ 43.98-45.07 の間に, 一方 tetrahydro-2H-pyrindine においては δ 40.55-40.96 の間に現れる。

Table 1. ¹H-NMR data of pigments A-I

| | H-1 | H-3 | H-5 | H-6a or C ₆ -CH ₃ | H-6b | H-7 | H-9 | H ₃ -10or H ₂ -10 | OCH ₃ | NCH ₃ |
|---------|----------------|----------------|-------------------|--|--------------------------------|---------------------|------------------------|--|------------------|------------------|
| genipin | 4.78d (8.3) | 7.52s | 3.14br q (8.6) | 2.82br dd (16.6,9.0) | 2.02ddt (16.6,9.0,5.8) | 5.82br s | 2.48t (7.3) | 4.22br ABq (14.6) | 3.70s | --- |
| A | 7.76m | 7.73d (1.5) | --- | 6.84dd (2.9,0.5) | --- | 7.14dq (2.9,1.0) | --- | 2.47d (1.0) | 3.97s | 3.95s |
| B | 7.57d (1.5) | 7.38d (1.5) | --- | 2.46s | --- | 6.90br s | --- | 2.41br s | 3.92s | 3.80s |
| C | 7.57m | 7.65d (1.5) | --- | 6.85br d (2.9) | --- | 7.23d (2.9) | --- | 4.51s | 3.96s | 3.76s |
| D | 7.95m | 7.84d (1.5) | --- | 6.95dd (3.2,0.7) | --- | 7.33d (2.9) | --- | --- | 4.02s | 4.00s |
| | 4.04d (9.0) | 7.59s | 3.22br q (7.5) | 2.88ddm (16.3,7.3) | 2.15ddm (16.3,7.3) | 5.73m | 3.00br dd (9.0,7.2) | 3.34m | 3.73s | 2.58s |
| E | 7.82d (1.5) | 7.48d (1.5) | --- | 2.46s | --- | 7.07s | --- | --- | 3.94s | 3.90s |
| | 4.02d (9.0) | 7.56s | 3.19br q (7.6) | 2.83ddm (16.1,7.6) | 2.12ddm (16.1,7.6) | 5.71m | 2.98br dd (9.0,7.8) | 3.36br s | 3.71s | 2.95s |
| F | 7.72d (1.5) | 7.54d (1.5) | --- | --- | --- | 7.04q (1.0) | --- | 2.42d (1.0) | 3.86s | 3.92s |
| | 4.97d (6.6) | 7.61br s | 3.13br q (6.8) | 2.72ddqu (15.9,7.3, 1.0) | 2.23ddqu (15.9,6.3, 2.0) | 5.67m | 3.01td (6.8,1.0) | 3.65br s | 3.70s | 2.75s |
| G | 5.02d (5.9) | 7.54s | --- | ~2.65m | 2.25-2.07m | 5.72br s | --- | 3.80ABq (~13.0) | 3.68s | 2.78s |
| | 7.95d (1.5) | 7.62d (1.5) | --- | --- | --- | 7.16s | --- | --- | 3.88s | 3.97s |
| | 3.97d (9.5) | 7.58s | 3.20br q (8.1) | --- | 2.25-2.07m | 5.72br s | 2.89br t (8.1) | 3.33ABq (14.9) | 3.72s | 2.55s |
| H | 7.66m | 7.69d (1.5) | --- | 6.84dd (2.9,0.7) | --- | 7.21d (2.9) | --- | --- | 3.96s | 3.85s |
| | 7.55d (1.5) | 7.46d (1.5) | --- | --- | --- | 7.16br s | --- | 4.49s | 3.84s | 3.74s |
| | 4.95d (7.1) | 7.61br s | 3.11br q (6.9) | 2.99ddm (16.5,6.9) | 2.23ddm (16.5,6.8) | 5.68m | 3.02br t (7.3) | 3.96br s | 3.68s | 2.77s |
| I | 7.65d (1.5) | 7.52d (1.5) | --- | --- | --- | 7.16br s | --- | 4.45br s | 3.82s | 3.85s |
| | 5.08d (5.9) | 7.62s | 3.15-2.88m | 2.70br dd (17.3,6.4) | 2.28br d (17.3) | 5.70br s | 3.15-2.88m | 3.83br s | 3.68s | 2.73s |

Table 2. ¹³C-NMR data of pigments A-I

| | C-1 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | C-7 | C-8 | C-9 | C-10 | C-11 | OCH ₃ | NCH ₃ | 6-CH ₃ |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|------------------|------------------|-------------------|
| genipin | 97.67d | 154.30d | 111.60s | 37.44d | 39.86t | 128.41d | 145.36s | 48.27d | 61.46t | 169.86s | 51.73q | --- | --- |
| A | 129.43d | 126.78d | 113.65s | 128.02s | 104.45d | 132.98d | 122.74s | 115.57s | 11.97q | 167.72s | 51.76q | 44.56q | --- |
| B | 128.80d | 125.76d | 115.23s | 128.63s | 116.62s | 136.93d | 113.48s | 115.30s | 11.63q | 167.87s | 51.62q | 43.98q | 15.13q |
| C | 130.57d | 126.93d | 113.56s | 127.13s | 103.80d | 132.62d | 123.49s | 120.99s | 26.79t | 167.69s | 51.79q | 44.64q | --- |
| D a | 130.36d | 127.51d | 114.47s | 126.25s | 104.79d | 134.23d | 125.06s | 117.05s | --- | 167.16s | 51.93q | 45.07q | --- |
| b | 57.19d | 147.77d | 100.22s | 37.90d | 39.50t | 127.10d | 146.97s | 49.07d | 61.23t | 169.35s | 50.52q | 40.55q | --- |
| E a | 129.48d | 126.03d | 116.32s | 126.88s | 118.83s | 137.73d | 113.89s | 116.49s | --- | 167.53s | 51.89q | 44.56q | 15.23q |
| b | 56.77d | 147.77d | 100.10s | 37.73d | 39.48t | 127.20d | 146.83s | 49.45d | 61.32t | 169.38s | 50.52q | 40.62q | --- |
| F a | 129.56d | 127.51d | 114.57s | 128.66s | 117.54s | 132.11d | 116.32s | 118.51s | 11.89q | 167.32s | 52.13q | 44.34q | --- |
| b | 54.61d | 148.19d | 98.44s | 36.58d | 38.96t | 127.63d | 146.43s | 49.79d | 60.96t | 169.38s | 50.30q | 40.91q | --- |
| G a | 54.97d | 148.16d | 98.66s | 36.70d | 38.90d | 128.73d | 146.14s | 49.53d | 60.76t | 169.38s | 50.40q | 40.99q | --- |
| b | 130.48d | 127.80d | 115.71s | 125.44s | 120.58s | 133.84d | 116.15s | 118.95s | --- | 167.50s | 52.35q | 44.81q | --- |
| c | 57.75d | 147.56d | 100.54s | 37.97d | 39.46t | 126.20d | 146.90s | 49.33d | 61.08t | 169.33s | 50.57q | 40.57q | --- |
| H a | 130.65d | 127.49d | 114.74s | 127.34s | 103.65s | 132.64d | 122.99s | 115.42s | --- | 167.75s | 51.76q | 44.59q | --- |
| b | 130.33d | 127.17d | 113.70s | 127.71s | 120.58d | 131.45d | 119.29s | 123.84s | 27.00t | 167.60s | 52.13q | 44.42q | --- |
| c | 54.71d | 148.19d | 98.42s | 36.78d | 38.99t | 128.00d | 146.32s | 49.20d | 60.98t | 169.25s | 50.30q | 40.94q | --- |
| I a | 130.66d | 127.73d | 114.20s | 127.15s | 114.96s | 131.09d | 119.06s | 121.64s | 27.07t | 167.69s | 52.16q | 44.24q | --- |
| b | 54.43d | 148.01d | 97.73s | 36.27d | 38.54t | 127.85d | 145.60s | 49.80d | 60.67t | 168.75s | 50.16q | 40.96q | --- |

4) C-10 の methyl 基 (δ 11.8 付近) は C-6 に付いた methyl 基 (δ 15.1 付近) よりも高磁場に現れる。

5) tetrahydro-2*H*-pyrindine の 2*H*-pyrindine 骨格上の結合位置は次のデータより決定できる。

i) 2*H*-pyrindine 骨格上の 6 位あるいは 8 位に methyl 基がある場合は, 4) に示した事実より逆に tetrahydro-2*H*-pyrindine の結合位置が推定できる。

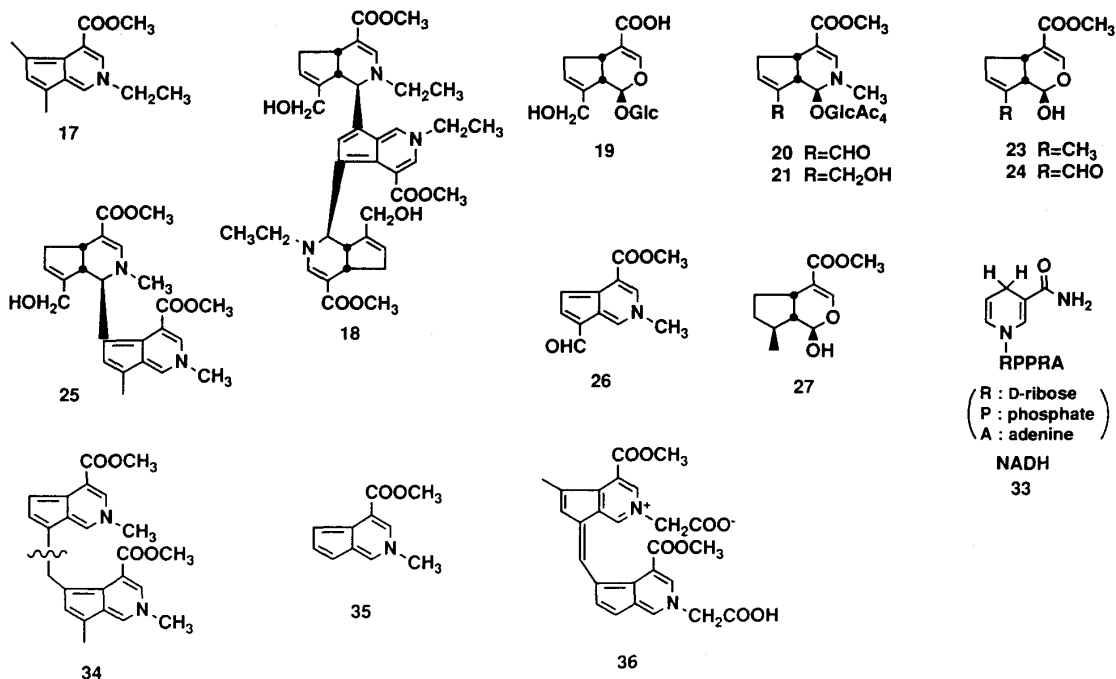
ii) tetrahydro-2*H*-pyrindine の 1' 位と 2*H*-pyrindine の 8 位が結合した場合は, C-1' は δ 56.5 より低磁場に, また 1' 位と 6 位が結合した場合は, C-1' は δ 55.0 より高磁場に現れる。さらに, C-1' の J_{C-H} 値は, 前者の場合は 137-136 Hz を, 一方後者の場合は, 140-142 Hz を示す。

ちなみに, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて, H-1' は前者の場合 δ 3.97-4.04 ($J=9.0-9.5$ Hz) に, 後者の場合 4.95-5.04 ($J=6.0-7.1$ Hz) に現れることから判定できる。

以上述べてきたように, genipin と methylamine とより形成される青色色素に至る低分子の中間体の構造を明らかにすることが出来た。これらが青色色素の構成成分と考えられる 2*H*-pyrindine 骨格を有するユニークな構造を有していることから, 我々は次にそれらの生成機構を検討した。

色素 B, E における C-6 位のメチル基の起源

上述の赤褐色の単量体から 4 量体 A-I (3-11) のうち, 色素 B (4), E (7) は C-6 位にメチル基を持っている。しかしながら, 反応原料である genipin (1) は C-6 位にメチル基を持っていない。そこで, このメチル基の起源を調べた。genipin (1) と methylamine との反応に際しては McIlvaine 緩衝液-エタノールの混合液を用いているので, この媒質からメチル基が導入される可能性は考えられない。次に, 基質である genipin (1) の構造を考えた場合, C₁ 単位の起源となり得るものとしては 10 位の methyl 基と carbomethoxy 基中の methyl 基の二つが考えられる。さらに, もう一つの基質である methylamine の methyl 基が導入される可能性もある。



Formulae (2)

まず、methylamine に由来する可能性を除去するために、methylamine の代わりに ethylamine を用いて同様の反応を行ったところ、色素 B (4) および H (10) に対応する17および18が得られた。しかしながら、両色素とも N-ethyl 基は観測されたが、17の6位にはethyl基は検出されず methyl基が観測されたのみであった。この事実はmethylamine の methyl 基は色素 B (4) および E (7) の6位の methyl 基の起源にはなり得ないことを示している。

次に、genipin (1) 由来の可能性を検討した。上述の9種の色素のうち、D (6), E (7), G (9) では10位の methyl 基が脱離している。この methyl 基が6位に転移したものと考えるのが最も妥当であろう。しかし carbomethoxy 基の methyl 基が6位に導入された可能性も現段階では否定できない。そこで、両可能性を検討するために、genipin (1) の、10位の methyl 基を重水素標識したものと carbomethoxy 基の methyl 基を重水素標識したものとを各々合成し、それらを用いて同様の反応を行うこととした。²H-carbonylmethoxy]-genipin (1) は、geniposide (2) のアルカリ加水分解により得た geniposidic acid (19) を D₂O-dioxane 中 diazomethane etherate でメチル化し、続いて β -glucosidase で加水分解することにより調製した。次に、[10-²H]-genipin (1) は次のような経路により合成した。geniposide (2) を既報¹⁹の方法に従い aldehyde (20) に導き、これを sodium borodeuterite で還元することにより重水素を導入した。ここに得た [10-²H]-geniposide tetraacetate (21) をアルカリで続いて β -glucosidase で加水分解し、目的の [10-²H]-genipin (1) を得た。

[²H-carbonylmethoxy]-genipin (1) を methylamine と窒素下反応させ、種々のクロマトグラフィーにより精製し、色素 B (4-d) を単離した。この色素の carbomethoxy 基には ²H の存在が認められたが、6位に付いた methyl 基には ²H は認められなかった。一方、[10-²H]-genipin (1) についても同様の条件で methylamine と反応させ、7種の色素 A-G (3-9) を単離した。これらの色素の各 2H-pyridine 部分と tetrahydro-2H-pyridine 部分の10位の methyl 基には、当然ながら ²H の存在が認められた。その上、色素 B (4-d₂) と E (7-d₂) においては各 2H-pyridine 部分の6位に付いた methyl 基からも ²H が検出された。従って、色素 B (4) と E (7) の6位に付いた methyl 基は genipin (1) の10位の methyl 基に起因することが明らかとなった。

赤褐色色素の反応中間体と相互関係の検討

赤褐色色素の相互関係を検討する前に、赤褐色色素の生成に際に同時に生成することが観察されていた黄色物質22の単離と構造解析を試みた。本物質は TLC 上で単量体 A (3), B (4) と二量体 D (6), E (7), F (8) の間に位置しており、非常に不安定で、単離操作中にもまた NMR スペクトルの測定中にも徐々に赤褐色色素に変換する。この物質の構造は本物質、genipin (1) と赤褐色単量体 A (3) の NMR スペクトルの比較より推定された。さらにプロトン配列は INDOR 法により確認された。即ち22の ¹H-NMR スペクトルにおいて、3-H は δ 7.08 に doublet (J=1.0 Hz) として、1-H, 7-H と 10-H は5.98, 5.77と4.32に各々 multiplet として、COOCH₃ と N-CH₃ は3.96と3.11に singlet として、5-H は3.27に multiplet として、6-H₂ は2.91と2.16に各々 multiplet として現れた。これらのデータよりこの黄色物質が22の構造をもつものと推定された。22をさらに同一条件で、本物質が消失するまで反応させたところ、赤色素 A-G (3-9) が得られた。従って22は赤褐色色素すべての反応中間体であることが判明した。

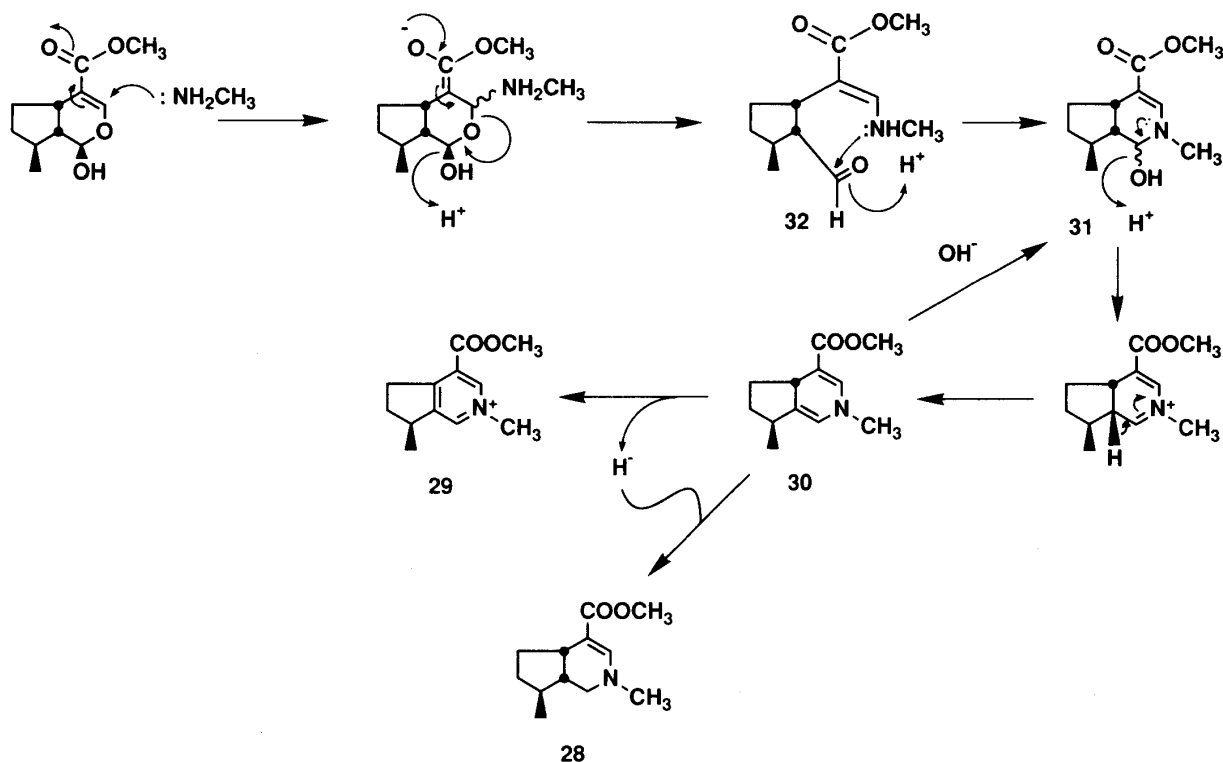
次に赤褐色色素の相互関係を検討した。この実験では、高速液体クロマトグラフィーにより分取した単一なサンプルを用い、赤褐色色素の調製の場合と同じ条件で反応を行った。しかしながら、赤褐色色素 A-G (3-9) の相互変換は観測されなかった。

赤褐色色素生成における genipin (1) の10位の水酸基の役割

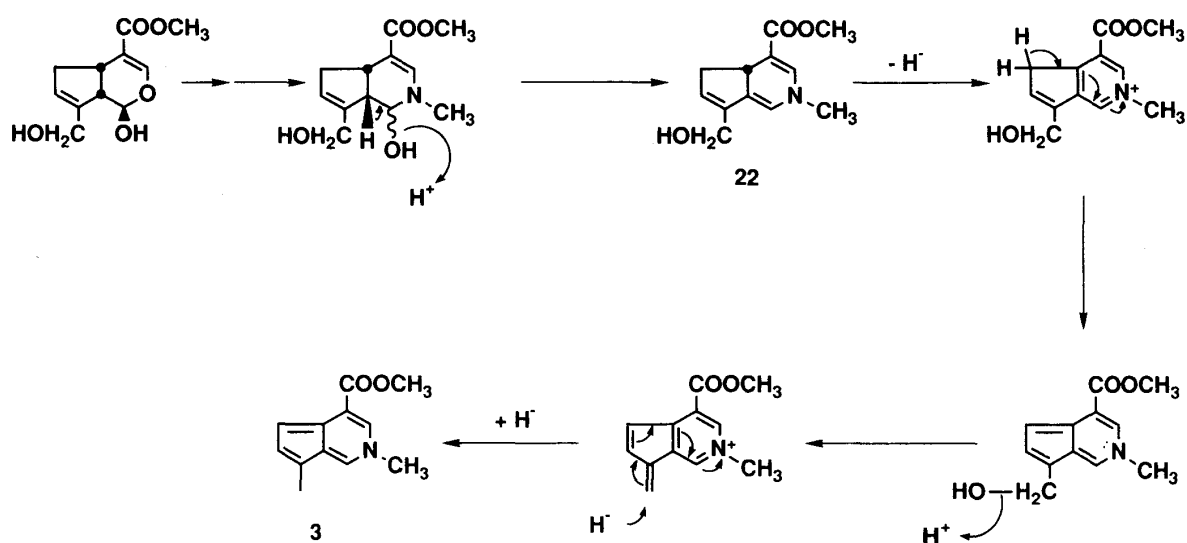
10-deoxygenipin (23) と 10-dehydrogenipin (24) を用いてこの問題を検討した。23を赤褐色色素を調製する条件で methylamine と反応させたところ、赤褐色色素 A (3) と共に、25が得られた。一方、24を同条件下で反応させたところ、26のみしか得られなかった。これらの結果は、genipin (1) のオリゴマー化反応や10位炭素の6位炭素への転移反応には10位の水酸基が不可欠であることを示している。

赤色単量体 A (3) の生成機構の検討

10-deoxygenipin (23) の 7,8-dihydro 体である deoxyloganin aglucone (27) を EtOH-McIlvaine 緩衝液 (pH 7.2) 中70°Cで methylamine と反応させたところ、28, 29が得られた。一方、27を EtOH-H₂O 中で methylamine と反応させ、ついで NaHCO₃ で pH 9.1 とした後、さらに45分間攪拌したところ、30, 31が得られた。これらの構造は ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS の各種スペクトルデータより推定された。これらの生成物の構造に基づき、これらの生成機構を Scheme 1 のように推定した。即ち genipin (1) の3位のオレフィン炭素を methylamine が求核的攻撃し、続いてピラン環が開裂し、中間体32が生成する。ついで32においてアミノ基がアルデヒド基の炭素を攻撃し、31となり、脱水反応により30が形成する。中性条件では30の5位の水素がヒドライドとして脱離し29が、またこのヒドライドが30の1位のオレフィン炭素を攻撃し28が生成する。一方、アルカリ条件下では、30の1位のオレフィン炭素を水酸イオンが攻撃し、31が再生するものと考えられる。この反応機構からも、また中間体30が補酵素 NADH (33) と構造上類似して



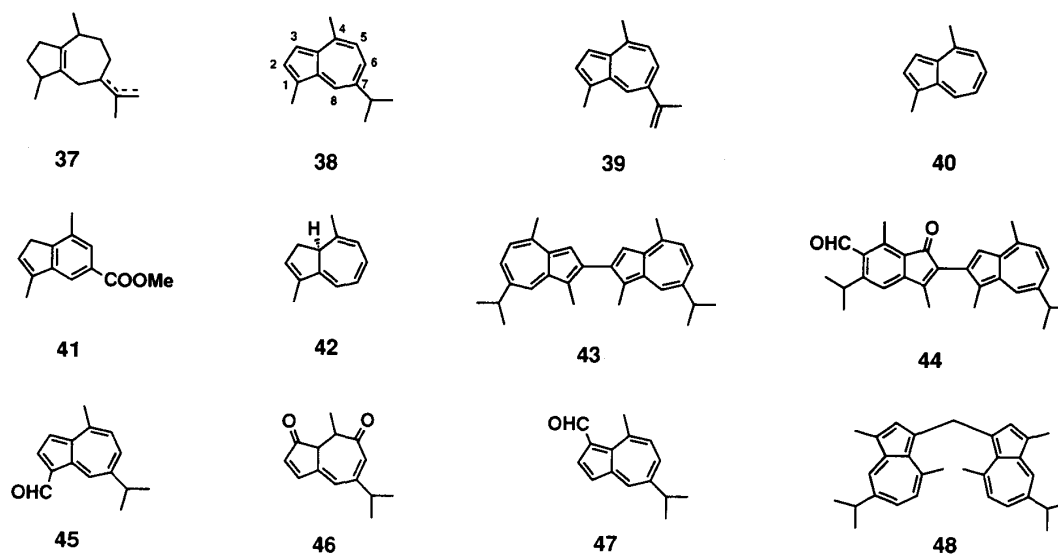
Scheme 1



Scheme 2

いることから、**30**の5位の水素がヒドライドとして脱離するものとするのは妥当であろう。このような考察を基に、色素A (**3**)の生成機構をScheme 2のように推定した。

しかしながら、このような反応機構は、赤色の二量体D (**6**)、E (**7**)、F (**8**)、三量体G (**9**)、H (**10**)や四量体I (**11**)の生成には適用できるが、B (**4**)、C (**5**)の生成を説明することはできない。B (**4**)が生成するためには、一旦**34**のような中間体ができ、heterogenousな炭素-炭素開裂が起こり、B (**4**)と**35**が生成し、**35**はさらにオリゴマー化し、二量体、三量体、四量体が生成するものと推定される。B (**4**)とC (**5**)の生成機構、さらに青色色素の構造および生成機構は今後検討すべき問題である。



Formulae (3)

低分子青色色素

先にも述べたように、色素 A (3), B (4) は赤褐色をしているのに対し、色素 C (5) をエタノール-McIlvaine 緩衝液中酸素を通導して得られる16は青色である。従って、2*H*-pyrindine 骨格を持つ色素が青色を呈するには、分子内に最小単位として16のような二量体を含有する必要があると推定される。藤川らも独自に genipin (1) と glycine との反応により同様な青色の二量体 genipocyanin-G₁ (36) を得ているが、この二量体は36の twitterion 構造をもつことを報告している²⁰⁾。これらの事実から、現段階では、高分子青色色素はこのような二量体を最小単位とした重合体であると想像される。

天然のアズレンと 2*H*-pyrindine 骨格を有する色素との比較

アズレン (azulene) は guaiane (37) のようなセスキテルペンの構造研究の過程で、それらを硫黄やセレンで脱水素反応した時に得られた。その後、天然からも guaiaazulene (38)²¹⁾ や lactarazulene (39)²²⁾ が単離された。最近武田らは、ゼニゴケの一種 *Calypogeia granulata* の培養細胞から trinorsesquiterpenoid である 1,4-dimethylazulene (40) と 3,7-dimethylindene-5-carboxaldehyde (41) と共に、非常に不安定な 3,10-dihydro-1,4-dimethylazulene (42) を単離した²³⁾。彼らはまた ¹³C 標識を用いた投与実験により後者が前二者の中間体であることも証明した²³⁾。これら天然アズレンは、上述の 2*H*-pyrindine 骨格を有する色素と同様10π 系の芳香族性を持つが、単独で濃青色を呈しており、空気に曝されると徐々に酸化されて赤色や紫色などの種々の物質に変化することが知られている。このような構造面と現象面での類似性に加え、生合成中間体42が上述の赤褐色物質 A-I (3-11) の生成の際に反応中間体として得られた黄色物質22と構造的に対応している点を考えると、azulene と 2*H*-pyrindine との対比は興味あることである。

近年、松原らはこのアズレン類の酸素酸化の研究を行い、30種近くの三量体以下の生成物を単離しそれらの構造を明らかにした²⁴⁻³²⁾。これらの生成物の構造を見ると、アズレン同士のカップリングによる二量体 (43)、アズレンと七員環の環縮小により生成するベンゼン系化合物とのカップリングによる生成物 (44)、側鎖の酸化物 (45)、核の酸化によるアズレンキノン (1,7-azulenoquinone; 46) 等アズレン核特有の反応生成物の他に、3-formylguaiaazulene (47) や 3,3'-methylenebisguaiaazulene (48) 等一個の extra 炭素を含む物質も得ている。化合物48は既に Scheuerらによって深海動物八方サンゴの一種ゴルゴニアの青色色素成分として数種の guaiaazulene 誘導体と共に単離されている³³⁾。この extra 炭素は guaiaazulene 骨格の 5 位炭素に由来することが解明され、また47, 48の生成はラジカル機構で説明されている。一方、上述の赤褐色色素 B (4) や E (7) の生成に際し反応中間体34を想定しているが、その形成にはイオンの機構でも説明できるが、heretogenous な炭素-炭素開裂反応にはラジカルが関与しているように思われる。この問題に関してはさらに詳細に検討する必要がある。

このように azulene と 2*H*-pyrindine (正確には 4-carbomethoxy-2*H*-pyrindine と云った方がよいのかもしれない) とでは現象的には類似した反応を示すが、それらの反応性は (酸化的条件か非酸化的条件かの違いもあり一義的に比較することはできないが) 随分異なっているように思われる。今後両者の反応を比較しつつ、genipin (1) とアミン類との反応により生成する青色色素の構造、生成機構あるいは構成単位である 2*H*-pyrindine の反応性を検討していきたい。

おわりに

私は本学着任まもなく本誌の総説の執筆依頼を受けました。その際現在までに行ってきた研究の内容を紹介してはどうかというお話で、その時は深く考えずにお引き受けしたが、後で考えれば、現在までの研究成果をまとめるとい

う回顧的作業は現時点ではふさわしくないと考え、本稿では現在は中断した形になっている表題の仕事を総括し今後の展開についても触れることにした。この研究については口頭では発表した^{a)}が、未だ論文としては公表していないので多少詳しく記述し過ぎた部分もあるが、お赦し頂きたい。

本研究は井上博之京都大学名誉教授の下で行ったもので、ここに同教授に深謝すると共に、共同研究者である武田美雄、遠山良介、生本 武、八塚政彦、漏留信晴、川村郁夫、新宮徹朗、横井利夫の諸氏に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) T. Yoshizumi, H. Okuyama and R. Touyama, *Shokuhin Kogyo*, **23**, 41 (1980).
- 2) C. Djerassi, J.D. Gray and F.A. Kincl, *J. Org. Chem.*, **25**, 2174 (1960).
- 3) C. Djerassi, T. Nakano, A.N. Tames, L.H. Zalkow, E.J. Eisenbraun, and J.N. Shoolery, *J. Org. Chem.*, **26**, 1192 (1961).
- 4) H. Inouye, S. Saito, H. Taguchi and T. Endo, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 2347.
- 5) T. Endo, H. Taguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1066 (1970).
- 6) H. Inouye, S. Saito and T. Shingu, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 3581.
- 7) T. Endo, H. Taguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2684 (1973).
- 8) H. Inouye, Y. Takeda, S. Saito, H. Nishimura and H. Sakuragi, *Yakugaku Zasshi*, **94**, 577 (1974).
- 9) H. Inouye, Y. Takeda and H. Nishimura, *Phytochemistry*, **13**, 2219 (1974).
- 10) Y. Takeda, H. Nishimura, O. Kadota and H. Inouye, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2644 (1976).
- 11) H. Okuyama, R. Touyama and Y. Sawada, Japanese Patent 77/53934; *Chem. Abstr.*, **87**, P100861 (1977).
- 12) R. Touyama, H. Inouye, T. Shingu, Y. Takeda, T. Ikumoto, H. Okuyama and O. Yamamoto, Japanese Patent 79/86668; PCT Int. Appl. 79 00394; *Chem. Abstr.*, **91**, 173683g (1981).
- 13) R. Touyama, T. Yanaki, H. Inouye and H. Sezaki, unpublished data.
- 14) K. Yamauchi, N. Fujimoto, S. Kuwano, H. Inouye and K. Inoue, *Planta Medica*, **30**, 39 (1976).
- 15) A.G. Anderson, Jr., W.F. Harrison and R.G. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3448 (1963).
- 16) T. Sakan, A. Fujino, F. Murai, Y. Butsugan and A. Suzui, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **32**, 315 (1960).
- 17) E. Wenkert, K.G. Dave, F. Haglid, R.G. Lewis, T. Oishi, R.V. Stevens and M. Terashima, *J. Org. Chem.*, **33**, 747 (1968).
- 18) H. Inouye and T. Arai, *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 968 (1964).
- 19) K. Inoue, Y. Takeda, H. Nishimura and H. Inouye, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 3115 (1979).
- 20) S. Fujikawa, Y. Fukui, K. Koga, T. Iwashita, H. Komura and K. Nomoto, *Tetrahedron Letters*, **28**, 4699 (1987).
- 21) Pl. A. Plattner and I. Lemay, *Helv. Chim. Acta*, **23**, 897 (1940).
- 22) F. Sorm, V. Benesova and V. Herout, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **19**, 375 (1953).
- 23) R. Takeda and K. katoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4056 (1983).
- 24) T. Nozoe, S. Takekuma, M. Doi, Y. Matubara and H. Yamamoto, *Chemistry Lettrs*, **1984**, 627.
- 25) Y. Matsubara, S. Takekuma, K. Yokoi, H. Yamamoto and T. Nozoe, *Chemistry Letters*, **1984**, 631.
- 26) Y. Matsubara, S. Takekuma, H. Yamamoto and T. Nozoe, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **60**, 455 (1987).

-
- 27) Y. Matsubara, S. Takekuma, K. Yokoi, H. Yamamoto and T. Nozoe, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **60**, 1415 (1987).
 - 28) 松原義治, 武隈真一, 井端勝裕, 山本啓司, 野副鉄男, 日化, **1988**, 1555.
 - 29) Y. Matsubara, S. Takekuma, H. Yamamoto and T. Nozoe, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **60**, 455 (1987).
 - 30) S. Takekuma, Y. Matsubara, H. Yamamoto and T. Nozoe, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **60**, 3721 (1987).
 - 31) S. Takekuma, Y. Matsubara, H. Yamamoto and T. Nozoe, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **61**, 475 (1988).
 - 32) 松原義治, 森田全律, 武隈真一, 山本啓司, 野副鉄男, 日化, **1990**, 67.
 - 33) M.K.W. Li and P.J. Scheuer, *Tetrahedron Letter*, **25**, 587 (1984).