

Genipin とアミノ酸より生成する Pseudoazulene 骨格をもつ青色々素の構造に関する研究

京大薬 井上博之, 武田美雄, 井上謙一郎, 川村郁夫
○ハ塚政彦

台糖研 遠山良介, 生本 武
神戸学院大薬 新宮徹朗, 横井利夫

中南米に産する *Genipa americana* L. (アカネ科) の果実は、原住民により古来食用に使されてきたが、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る。Djerassi らは本植物の果実より genipin (1) を単離、構造決定した^{1,2)} が、その際 genipin がグリシンを始めとするアミノ酸と容易に反応し青色高分子性物質を生成することを観察している。¹⁾ 一方クチナシ (*Gardenia jasminoides* Ellis; アカネ科) 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。³⁾ また同果実は山梔子と呼ばれ漢方で薬用されており近年ニ、三の薬理作用も実証されている。桑野らは特にその腸下作用が geniposide (2) の腸内での加水分解によって生じる genipin (1) によるものであることを示したが、その際実験に用いたマウスの腸管壁を取出し空気に曝すと管壁が青変することも観察している。⁴⁾ この現象は genipin (1) が腸管壁のアミノ酸残基と酸素存在下反応して青色々素を生成したものと説明される。近年食用色素として安全な天然色素が求められているが、genipin とアミノ酸より生成する青色々素は最近の研究によりその安全性が証明され、その要求に合致するものである。しかしその構造など化学的な面については全くわかっていなかったため、我々はこの青色々素の構造並びに生成機構の解明を目的とし、今回その基礎研究を行った。

1) 青色々素生成のための反応条件の検討

上述の二つの青変現象にはアミノ酸のアミノ基が関与していることが予想されたのでまず計 25 種のアミノ酸およびアミンについて色素生成の有無を調べた。その結果、monomethylamine, monoethylamine, 1 級アミノ基をもつアミノ酸など 1 級アミン構造をもつ物質のみが青色々素を生成することがわかった。そこで煩雑さを避ける

ため最も簡単な1級アミンである monomethylamine を反応相手として選び、青色々素の構造並びに生成機構について検討することとした。

色素生成条件を種々検討した結果、最適 pH は 7.3 であり、genipin (1) と monomethylamine のモル比が 0.1 ~ 0.4 のとき genipin (1) の色素への変換率が良いことがわかった。また窒素気流中 genipin (1) と monomethylamine とを反応させる(詳細な反応条件は後述する)と反応液は黄色 → 黄橙色 → 赤褐色と順次変化するが青色々素は生じないこと、しかしこの反応液に酸素を通導しながら反応を続行すると青色々素が生成し反応液が青変することを認めた。従って青色々素の生成には酸素が必要であることが明らかとなった。

このようにして生成した青色々素は最後に述べるように多種多様な高分子体の混合物であり、それらの構造を直接解明することは困難であることがわかった。しかし前述したように genipin (1) と monomethylamine とを窒素気流中で反応させて得られる赤褐色物質が青色々素に至る中間体でもあり、また青色々素を構成する単位物質でもあろうとの予想の下に、まずこれら赤褐色物質を分離精製しそれらの構造を解明することとした。

2) 低分子赤褐色物質の捕捉と構造

これら赤褐色物質の生成には大別して次の3条件が採用された。

(i) genipin (1) (2 mmole) と monomethylamine 塩酸塩 (6 mmole) を McIlvaine 緩衝液 (pH 7.2) とエタノールとの等量混合液 (40 ml) に溶かし、アルゴンガスあるいは窒素ガス中窒温で2時間撹拌しながら反応させる。(ii) ①の条件で反応温度のみを 70°C に上げる。(iii) 高圧水銀灯照射下②の条件で反応させる。これらの条件下で得られた反応生成物は中性アルミナ上のカラムクロマトグラフィーにより3画分に分離した。各画分はさらにシリカゲル上での preparative layer chromatography により、また必要に応じて高速液体クロマトグラフィー (μ -Bondapak) を併用することにより精製した。このようにして単離した生成物は、モノテルペン単位1個より成る monomer から4個よりなる tetramer までであった。即ち monomer としては A, B の2種, dimer としては C, D, E, F の4種, trimer としては G, H の2種また tetramer としては I 1種のみが得られた。反応条件と生成物との関係を Table 1 に示した。

Table 1. 不活性ガス中 genipin (1) と monomethylamine との反応より得られた赤褐色生成物

反応条件	反応生成物			
	monomer	dimer	trimer	tetramer
1	A, B	C, D, E	G, H	—
2	A, B	C, D, F	G	—
3	—	D, E	G, H	I

monomer A (3): $C_{12}H_{13}NO_2$, mp 148–149.5°C, 赤色針状晶.
 UV λ_{max}^{EtOH} (log ϵ): 284 nm (4.31). IR ν_{max}^{KBr} : 1710, 1630, 1440 cm^{-1} .
 1H NMR (in $CDCl_3$) δ : 7.65 (d, $J=1.0$ Hz, C_1-H), 7.65 (s, C_3-H), 7.12 (dd, $J=0.7$ and 2.7 Hz, C_7-H), 6.82 (dd, $J=1.0$ and 2.7 Hz, C_6-H), 3.95 (s, $-COOCH_3$), 3.84 (s, $N-CH_3$), and 2.45 (d, $J=0.7$ Hz, $C_{10}-H_3$). ^{13}C NMR (in $CDCl_3$) δ : 167.60 (s, $-COOCH_3$), 132.74 (d, C_7), 129.48 (d, C_1), 127.82 (s, C_9), 126.82 (d, C_3), 122.77 (s, C_5), 115.40 (s, C_4), 113.29 (s, C_8), 104.15 (d, C_6), 51.68 (q, $-COOCH_3$), 44.43 (q, $N-CH_3$) and 11.64 (q, C_{10}).

なお 1H NMR スペクトルにおける各シグナルは decoupling, INDOE, NOE の各実験に基づいて帰属した。 ^{13}C NMR スペクトルの各シグナルは multiplicity, selective decoupling 実験並びに fulvene 誘導体, azulene 誘導体などのスペクトルとの比較により帰属した。これらのスペクトルデータに基づき monomer A に対し pseudoazulene (4) の骨格をもつ 3 の構造を推定した。

monomer B (5): $C_{13}H_{15}NO_2$, mp 138–139°C, 赤色針状晶. UV λ_{max}^{EtOH} (log ϵ): 283 nm (4.13). IR ν_{max}^{KBr} : 1715, 1630, 1440 cm^{-1} . 1H NMR (in $CDCl_3$) δ : 7.57 (d, $J=1.5$ Hz, C_1-H), 7.38 (d, $J=1.5$ Hz, C_3-H), 6.90 (br. s, C_7-H), 3.92 (s, $-COOCH_3$), 3.80 (s, $N-CH_3$), 2.46 (s, C_6-CH_3), and 2.41 (d, $J=1.0$ Hz, $C_{10}-H_3$). ^{13}C NMR (in $CDCl_3$) δ : 167.83 (s, $-COOCH_3$), 136.73 (d, C_7), 128.89 (d, C_1), 128.54 (s, C_4), 125.89 (d, C_3), 116.50, 115.18, 113.05 (each s, C_5 , C_6 , C_8), 115.18 (s, C_9), 51.55 (q, $-COOCH_3$), 43.81 (q, $N-CH_3$), 15.18 (q, C_6-CH_3), and 11.64 (q, C_{10}).

これらのスペクトルデータに基づき monomer B に対し 5 の構造を

推定した。

dimer C (6): $C_{24}H_{24}N_2O_4$, 赤色非晶物質。本物質の 1H および ^{13}C NMR スペクトルは monomer A (3) と類似しているが, 1H NMR で 3 の C_{10} 位 $\times 4$ ル基が消失し新たに $\delta 4.50$ に allyl 位 $\times 4$ レンプロトンに帰属できるシグナルが, また ^{13}C NMR で $\delta 26.79(t)$ のシグナルが現われている。またマスマスペクトルにおいて, m/e 404 に分子イオンが現われており, この値は monomer A (3) の分子イオン $[203(M^+)]$ の 2 倍したものであるから 2 を引いたものに一致する。従って dimer C に対し 6 のような対称構造を推定した。

dimer D (7): $C_{23}H_{26}N_2O_5$, $[\alpha]_{D50}^{25} + 43^\circ (c=0.18, MeOH)$, 赤色非晶物質。UV $\lambda_{max}^{EtOH} (\log \epsilon): 296 nm (4.52)$. IR $\nu_{max}^{CHCl_3} 3450, 1700, 1670, 1620, 1440 cm^{-1}$. 1H NMR (in $CDCl_3$) δ : 7.96 (br. d. $J=1.0 Hz$, C_1-H), 7.79 (d. $J=2.0 Hz$, C_3-H), 7.27 (d. $J=3.0 Hz$, C_7-H), 6.91 (d. $J=3.0 Hz$, C_6-H), 3.99 (s, $-C_{11}OOCH_3$), 3.97 (s, N_2-CH_3), 7.54 (s, $C_{3'}-H$), 5.71 (br. s, $C_7'-H$), 4.05 (d. $J=9.0 Hz$, $C_{1'}-H$), 3.70 (s, $-C_{11'}OOCH_3$) and 3.30 (s, $N_{2'}-CH_3$). ^{13}C NMR (in $CDCl_3$) δ : 167.03 (s, $-C_{11}OOCH_3$), 153.86 (d, C_7), 130.39 (d, C_1), 127.46 (d, C_3), 126.16 (s, C_9), 124.88 (s, C_5), 116.95 (s, C_4), 114.13 (s, C_8), 104.50 (d, C_6), 51.84 (q, $-C_{11}OOCH_3$), 44.97 (q, N_2-CH_3), 169.20 (s, $-C_{11'}OOCH_3$), 147.72 (d, $C_{3'}$), 146.83 (s, $C_{8'}$), 126.70 (d, $C_{7'}$), 99.86 (s, $C_{4'}$), 60.94 (t, $C_{10'}$), 56.89 (d, $C_{1'}$), 50.43 (q, $-C_{11'}OOCH_3$), 40.51 (q, $N_{2'}-CH_3$), 49.20 (d, $C_{9'}$), 39.39 (t, $C_{6'}$) and 37.75 (d, $C_{5'}$).

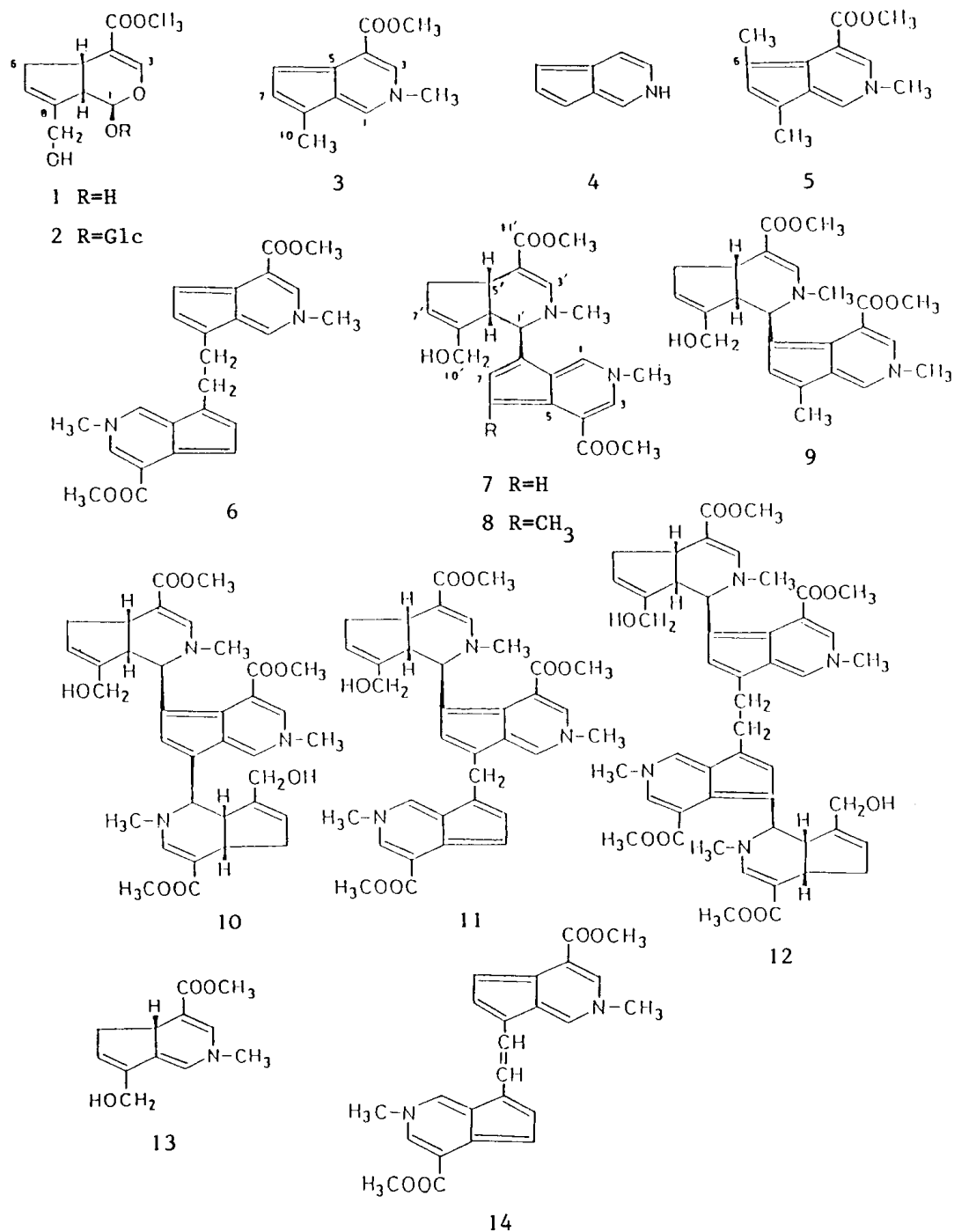
1H および ^{13}C NMR スペクトルにおいて pseudoazulene 部分は monomer A (3) および B (5) との比較, また tetrahydropseudoazulene 部分は genipin (1) との比較により各シグナルを帰属した。これらのスペクトルデータに基づき dimer D は 7 の構造をもつものと推定した。

その他, dimer E (8) $[\alpha]_{D50}^{25} + 22^\circ (c=0.20, MeOH)$, $C_{24}H_{28}N_2O_5$, 赤色非晶物質, dimer F (9) $[\alpha]_{D50}^{25} + 241^\circ (c=0.07, MeOH)$, $C_{24}H_{28}N_2O_5$, 赤色非晶物質] は上述の各物質のスペクトルデータとの比較により各々 8, 9 の構造をもつものと推定した。ここで, これらの物質の tetrahydropseudoazulene 部分の 5' 位, 9' 位の立体配置は当然 genipin (1) のそれを保持していると考えられる。また $J_{9-H, 1'-H}$ はいずれも約 9 Hz であった。従ってこれら物質における 1' 位と 9' 位のプロトンは trans

diaxial配置をとり, 1'位における pseudoazulene基は β , equatorial位をとるものと推定された。

残る trimer G, H, tetramer I も同様な方法により各々 10, 11, 12 の構造をもつものと推定した。

上述の反応に際し, 赤色生成物 9 種の他に, 数種の黄色物質が生成していることが認められた。しかしこれらは非常に不安定で容易に赤色あるいは青色物質に変換してしまうので単離が非常に困難である。



現在これらの単離精製に努力しているが、これらのうち一つの黄色物質 monomer J をほぼ単品で得ることに成功した。本物質は下記の ^1H NMR スペクトルより 13 の構造をもつものと推定した。

monomer J (13): ^1H NMR (in CDCl_3) δ : 7.12 (t, $J=1.2\text{ Hz}$, $\text{C}_3\text{-H}$), 6.01 (d, $J=1.2\text{ Hz}$, $\text{C}_1\text{-H}$), 5.80 (m, $\text{C}_7\text{-H}$), 4.37 (br. s, $\text{C}_{10}\text{-H}_2$), 3.70 (s, $-\text{COOCH}_3$), 3.30 (br. t, $J=7.1\text{ Hz}$, $\text{C}_5\text{-H}$), 3.15 (s, N-CH_3), 3.00 (br. dd, $J=8.3\text{ \& } 16.8\text{ Hz}$, $\text{C}_8\text{-H}$) and 2.25 (br. dd, $J=9.0\text{ \& } 16.8\text{ Hz}$, $\text{C}_6\text{-H}$). 本物質はその構造から考えて赤色物質および青色々素の生成にあたり最初に生ずる中間体の一つであろうと考えられる。

3) monomer B (5) および dimer E (8) における 6 位メチル基の起源
monomer B (5) と dimer E (8) は出発物質である genipin (1) の構造中にはないメチル基即ち 6 位メチル基をもつという点で特異な化合物である。これに対し 7, 8, 9, 10 などでは本来の genipin (1) の 8 位 CH_2OH 基に由来すべき炭素を構造中のどこかで欠いている。従って 5, 8 の 6 位メチル基は genipin (1) の 8 位 CH_2OH 基に由来する可能性が非常に強い。そこでこの推定を証明するために, geniposide (2) より 5 工程を経て合成した $[10\text{-}^2\text{H}]$ genipin (1) を monomethylamine と反応せしめた。その結果は、得られた 5 と 8 の 6 位メチル基において明らかに ^2H が検出された。従って monomer B (5) と dimer E (8) のメチル基が genipin (1) の 8 位 hydroxymethyl 基に由来することが明らかとなった。なお当然のことながらその際得られた物質は、5, 6, 7, 8, 9, 10 の 8 位メチル基および 8' 位 hydroxymethyl 基においても ^2H の存在が認められた。

4) 青色々素の性質

genipin (1) と monomethylamine との反応で一旦生成した低分子の赤褐色物質が酸素を通導すると青変することは既に述べたが、この場合赤褐色物質が直接青色々素に変換するのか、あるいは赤褐色物質が一旦 heterolytic 分解を受けて生じた分解物が重合し青色々素を生成するのかわ不明である。そこでこの問題を解明するためには、まず現在までに得られた赤褐色物質の性質を知る必要があると考え、これらの相互関係を調べた。比較的容易に単離できる 5, 8, 9, 10 は上述の (i) および (iii) の条件下で処理しても変化を示さなかった。3 と 7 については現在検討中であるが、これらの 6 位 (あるいはより一般的には pseudo-azulene 構造の 4, 6, 8 位) は非常に反応性に富む部位であることが推

定される。事実3, 7の¹H NMRスペクトルをCDCl₃-CD₃OD中で測定すると6位水素は容易に重水素置換を受けることが観察されている。従ってふおよび7より他の赤褐色物質への変換は充分予想されるところである。dimer C (6) を酸素存在下 50°C で5時間処理したところ、青色のdimer K (14) が得られた。C₂₄H₂₂N₂O₄ [M_e 402 (H⁺)], 青色非晶物質。UV λ_{max}^{MeOH} (log ε): 283 (4.14), 599 nm (4.73). IR ν_{max}^{KBr} 1710, 1570 cm⁻¹. ¹H NMR (in CDCl₃) δ: 9.38 (m, C₁-H), 8.24 (m, C₃-H, C₇-H, C₁₀-H), 7.40 (d, J=4.0 Hz, C₆-H), 4.27 (s, N-CH₃) and 4.05 (s, -COOCH₃). これらのスペクトルデータに基づき, dimer K に対し 14 の構造式が推定された。このように pseudoazulene 骨格をもつ低分子物質で青色を呈するものとしては dimer K (14) が初めて得られたものであり, 従ってこの系統の物質が青色を呈するには dimer K (14) と同等の共役系をもつ必要があると思われる。

一方高分子青色々素の¹³C NMR スペクトルを測定したところ, 現在までに得られた赤褐色物質の場合とはほぼ同じ領域にシグナルが現われた。この事実は青色々素も赤褐色物質と同じ構成単位をもつことを示している。また青色々素の分子量を膜浸透圧法で求めたところ, 平均分子量は $M = 8970 \pm 600$ であることがわかった。そこで monomer の分子量を 200 とすると青色々素の重合度は 43~45 であると考えられる。以上の結果を総合すると, genipin (1) と monomethylamine とより生成する青色々素は pseudoazulene 型および tetrahydropseudoazulene 型単位物質が重合した平均分子量約 9000 のホリマーで, その分子中には dimer K (14) と同等の共役系が断続して繰返し存在するものと推定される。この青色ホリマーは, (i) genipin (1) と 1 級アミンを酸素存在下で反応させると生成すること (ii) 酸素遮断下でもヨウ素を添加すると生成すること (iii) 酸素遮断下でも高圧水銀灯で光照射すると生成することなどを考慮するとラジカル重合により生成するものと想像できるが生成機構の詳細については現在検討中である。

参考文献

1. C. Djerassi, J. D. Gray and F. A. Kincl, *J. Org. Chem.* **25**, 2174 (1960). 2 C. Djerassi, T. Nakano, A. N. Tames, L. H. Zalkow, E. J. Eisenbraun and J. N. Shoolery, *J. Org. Chem.* **26**, 1192 (1961). 3 Y. Takeda, H. Nishimura, O. Kadota and H. Inouye, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2644 (1976) and references cited therein. 4 K. Yamauchi, N. Fujimoto, S. Kuwano, H. Inouye and K. Inoue, *Planta medica*, **30**, 39 (1976).

Structure of Blue Pseudoazulene-Skeleton
Pigment derived from Genipin and Amino acids

H. Inouye, Y. Takeda, K. Inoue, I. Kawamura and M. Yatsuzuka

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ.)

R. Touyama and T. Ikumoto

(Research Laboratory, Taito Company)

T. Shingu and T. Yokoi

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin Univ.)

Genipin (**1**) readily reacts with amino acids (or primary amines) in the presence of oxygen to give a mixture of blue polymeric pigments. We have carried out basic studies to elucidate the structure and formation mechanism of blue pigments using monomethylamine as a primary amine.

The reaction of genipin (**1**) with monomethylamine in the absence of oxygen afforded nine red substances: two monomers (one monoterpene unit) **3** and **5**, four dimers **6**, **7**, **8** and **9**, two trimers **10** and **11**, and one tetramer **12**. The compounds **3** and **5** possess a pseudoazulene skeleton, whereas the compounds **6** - **12** consist of pseudoazulene and tetrahydropseudoazulene units. In addition, the reaction also yielded a yellow monomer which seems to be the primary intermediate leading to red and blue pigments.

Measurement of the molecular weight of the polymeric pigment mixture as well as the comparison of its ^{13}C NMR spectrum with those of the above compounds suggested that the mixture has an average molecular weight of ca. 9000 and is composed of pseudoazulene and tetrahydropseudoazulene units. The chromophore of this polymeric mixture is presumably constituted of units like dimer **14**, which can easily be derived from dimer **6**. Also, there is some evidence to suggest that polymerization leading to pigment formation is caused by a radical reaction.