チューインガム製品中の銅クロロフィル類似物質の構造

大戸幹也,^a 山本 敦,^a 松永明信,^a 浅野泰久,^b

川田幸雄,^c 水上英一^a

富山県衛生研究所,^a 富山県立大学工学部,^b 北陸大学薬学部^c

Structure of Copper Chlorophyll Analogues in the Chewing Gum Product

MIKIYA OHTO,^a ATSUSHI YAMAMOTO,^a AKINOBU MATSUNAGA,^a YASUHISA ASANO,^b

YUKIO KAWATA^c and EIICHI MIZUKAMI^a

Toyama Institute of Health,^a 17-1, Nakataikoyama, Kosugi-machi, Toyama 939-03, Japan,

Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University,^b 5180 Kurokawa, Kosugi-machi,

Toyama 939-03, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku

University,^c 3-Ho, Kanagawa-machi, Kanazawa

920-11, Japan

(Received October 6, 1993)

Multiple copper chlorophyll analogues were detected in the chewing gum product containing the copper chlorophyll dye using a HPLC apparatus with photodiode array detection. The main components among these analogues were assumed to be 10-hydroxy copper chlorophyll a and b by IR, FAB/mass and NMR spectrometry.

Since these copper chlorophyll analogues were main components in the commercial food additive dye, "copper chlorophyll", it was clear that these analogues in the chewing gum product were carried over from this food additive. The 10-hydroxy pheophytins, which are precursors of these copper chlorophyll analogues, were detected from the extract of silkworm excreta, the original material of this dye.

These copper chlorophyll analogues were possibly produced by the metalation reaction between the copper and the 10-hydroxy pheophytins which might be generated from the oxidation of pheophytins, like "allomerization reaction", during the process of the synthesis of the original material and its storage. It is possible that these analogues have already been the main components in the original dye.

Keywords — chewing gum product; synthetic color; copper chlorophyll; copper chlorophyll analogue; pheophytin analogue

緒 言

銅クロロフィルは、クロロフィル分子中のポルフィリン環マグネシウム原子が銅原子に置換された構造を有し、比較的安定な緑色合成色素である。この色素は、チューインガムや缶詰食品の外、平成5年4月21日からはさらに蒲鉾やチョコレート等の食品にも使用が許可され、¹⁾ 今後使用量がますます増加すると考えられる。

著者らは、チューインガム製品中の銅クロロフィ

ル含有量を高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて分析する方法を開発して既に報告した。²⁾ 同時に公定方法との比較を行ったところ、HPLC 法では、チューインガムの5製品がすべて不検出 (0.1 µg/g 未満) であるのに対し、公定方法を用いた場合には、6.9—18.9 µg/g の銅クロロフィルを検出した。この差の原因は、公定方法が銅換算法を採用しているので、他の有機銅化合物も定量しているためと考えられる。そこで著者らは、これら未知有機銅化合物の主成分の構造の解明やその生成要因について検討を

行ったので報告する。

実験方法

1. 試料 銅クロロフィル使用表示のチューインガム製品及び食品添加物用銅クロロフィル製剤(日本葉緑素社製)は、市販品を購入した。銅クロロフィル製剤用の原料は、蚕糞からのアセトン抽出物製品(日本葉緑素社からの提供品)を試験に供した。

2. 標準溶液及び試薬 植物の葉から AOAC 法によって抽出したクロロフィルを原料として、Inoue らの方法³⁾に準じてフェオフィチンを経由して銅クロロフィルの合成を行った。後述の HPLC 条件に従って、銅クロロフィル a あるいは b 画分を分取した。集めた画分は、それぞれ原子吸光法によって銅含有量を求めた後、銅クロロフィル換算値 [銅クロロフィル a は 14.69 (M.W. 932.75/Cu 63.5), b は 14.91 (M.W. 946.73/Cu 63.5)] を乗じて、それぞれの銅クロロフィル濃度を算出し、適宜希釈して標準溶液を調製した。フェオフィチン a, b の各標準品は、和光純薬工業製の生化学用(クロレラ製)を用いた。なお、標準品の合成及び試験溶液の調製に用いる試薬は特級品を、その他は液体クロマトグラフ用を使用した。

3. 装置及び条件 高速液体クロマトグラフは、島津製作所製 LC-9 A 型ポンプ、レオダイン社製 7125 型インジェクター、島津製作所製 CTO-10 AC 型恒温槽、SPD-6 AV 型紫外可視吸光度検出器、SPD-M 6 A 型三次元フォトダイオードアレイ検出器及び C-R 3 A 型データ処理装置を用いて構成した。またその分析条件は、著者等の報告²⁾に従い、次のように行った。カラムは LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m), 4 mm i.d. $\times$ 250 mm (Merck 社製)、ガードカラムは LiChrosorb RP-18, 4 mm i.d. $\times$ 4 mm (Merck 社製)を使用し、移動相はアセトン-アセトニトリル (1:1) 溶液を 0.7 ml/min で送液した。カラム温度は 30°C、検出波長は 425 nm、試料注入量は 20 μ l とした。ただし、分取する場合は、カラムは μ BONDASPHERE 5 μ C 18-100 Å, 19 mm i.d. $\times$ 150 mm (Waters 社製)を用い、移動相の流速は 5 ml/min で行った。

原子吸光分析は、日本ジャーレルアッシュ社製 FLA-100 型フレームレス原子化装置及び同社製 AA-860 型原子吸光分光光度計を用い、常法により銅元素を分析した。

質量分析計は、日本電子製 JMS-DX 300 L, FAB (Fast Atom Bombardment) Mode を用い、マト

リックスに 3-ニトロベンジルアルコールを、不活性ガスに Xe を用いて測定した。

核磁気共鳴 (NMR) 装置は、日本電子製 JNM-EX 400 型 NMR 装置を用い、赤外吸収 (IR) 分光光度計は、パーキンエルマー社製 1600 型 FT-IR を用いて、KBr 錠により測定した。

4. 試料からの銅クロロフィルの抽出・精製 チューインガム製品中の銅クロロフィル類似物質の分析は、厚生省食品化学課編“食品中の食品添加物分析法”⁴⁾にほぼ準じ、カラムクロマトグラフィー精製を行った後、アセトンに転溶して HPLC で行った。

結果及び考察

1. チューインガム製品中の銅クロロフィル類似物質の分離

チューインガム製品を分析して得られたクロマトグラムを Fig. 1 の左図 (I) に示した。また、分析カラムからの溶出液を 0.14 ml ずつ集めた各画分について、原子吸光法により銅の含有量を求め、銅溶出クロマトグラムを作成して Fig. 1 の下側に示した。可視吸光値と銅濃度で描かれたクロマトグラム上の各ピークは一致し、チューインガム製品中の有機銅化合物では銅クロロフィル a 及び b が主成分ではないことが明らかとなった。次に、三次元フォトダイオードアレイ検出器によって各ピークの吸収スペクトルを解析した。主要なピーク a1, a2, a3 の各吸収スペクトルは、銅クロロフィル a 標準品のものとほぼ一致し、b1, b2, b3 の各吸収スペクトルは、銅クロロフィル b 標準品のものとほぼ一致した。以上の結果から、スペクトルが類似した物質は、銅-ポルフィリン環骨格を持った銅クロロフィル類似化合物であると推定された。

チューインガム製品は、ガムベースを基に、砂糖等の甘味料、軟化剤、香料及び銅クロロフィル等の色素が添加されて製造される。クロロフィル関連化合物は、銅クロロフィル色素以外の材料に含まれていない。したがって、銅クロロフィル類似物質の存在原因として、チューインガム製造中での銅クロロフィル色素の類似物質への変化、あるいは添加した銅クロロフィル色素製剤中の混在等が推定された。そこで、まずこれらを明らかにするため銅クロロフィル製剤の分析を行った。アセトンに溶解した銅クロロフィル製剤を、テフロン製メンブランフィルターでろ過した後、チューインガム製品の場合と同様な方法で分析し、得られたクロマトグラムを Fig.

Fig. 1. Chromatograms of a Chewing Gum Extract (I) and a Food Additive (II)

Upper chromatogram; by VIS absorption, Lower; by copper concentration.

Conditions for HPLC analysis were as follows: column, LiChrospher 100 RP-18 (5μ , 4 mm i.d. $\times$ 250 mm); mobile phase, acetone-acetonitrile (1:1); column temperature, 30°C; flow rate, 0.7 ml/min; detection wavelength, 425 nm; injection volume, 20 μ l.

Atomic absorption were detected at 3247.5 nm corrected by D₂ lamp with flameless atomizer.

1の(II)に示した。チューインガムと製剤から得られたクロマトグラムを比較したところ、可視吸光値及び銅濃度で得たクロマトグラムともほぼ一致した。また、三次元フォトダイオードアレイ検出器により、チューインガム製品の場合と同じく、図に示されているような銅クロロフィル類似物質(a1-3, b1-3)の存在が明らかになった。したがって、チューインガム製品から検出された銅クロロフィル類似物質は、製剤から混入したものと考えられる。そこで、次にこれらの類似物質の構造解析、及び生成要因の解明を試みた。

2. 銅クロロフィル類似物質の構造

銅クロロフィルa標準品及び製剤から分取した銅クロロフィル類似物質の質量分析を行った。Fig. 2に示したように、銅クロロフィルa標準品では、擬分子イオンピークが m/z 932に、一方、銅クロロフィルa類似物質では m/z 948に観察された。また、銅クロロフィルb標準品では m/z 946に、銅クロロフィルb類似物質では m/z 962に観察された。類似物質の質量数は、a, bいずれも標準品より16マスユニット大きな結果が得られた。

次にIR解析を行った。銅クロロフィル標準品a, bの透過率は、共に3200—3600 cm^{-1} の範囲では一

定であった。一方、銅クロロフィル類似物質a, bでは、すべて3330 cm^{-1} を頂点とする3150—3600 cm^{-1} の範囲に大きなアルコール性水酸基特有の吸収が認められた。三次元フォトダイオードアレイ検出器による可視スペクトルや質量分析結果と考え合わせると、類似物質の構造は、ポルフィリン環が酸化されたものと推定された。

一般に、化合物の構造決定には、NMRスペクトル測定が有効であるが、常時性金属である銅錯体化合物では、シグナルがシフトして解析困難となり、銅クロロフィル化合物には適用できない。ポルフィリンと銅の強力なキレート結合のみを、他の結合に影響を及ぼさずに切断することは困難であった。そこで銅錯体形成前の、すなわち銅金属化反応直前の製剤原料に類似物質の原料成分を求め、この対応成分のNMRスペクトル解析を行った。まず、銅クロロフィル製剤の原料である蚕糞のアセトン抽出物を、製剤と同様に処理してHPLC分析を行い、その結果をFig. 3の上図(I)に示した。検出はフェオフィチンaの吸収極大波長408 nmで行った。製剤原料中には、クロロフィルから金属が外れた分子であるフェオフィチンa, bの他に、三次元フォトダイオードアレイ検出器によってフェオフィチンaの吸収

Fig. 2. FAB Mass Spectrum of Copper Chlorophyll a

3-nitrobenzyl alcohol was used as FAB matrix.

Positive ion FAB mass spectrum was obtained by using a JEOL JMS-DX300L mass spectrometer.

Fig. 3. Syntheses of Copper Chlorophyll Analogues from Pheophytin Analogues

(I); Food additive material, (II); Synthetic products from pheophytin analogues, (III); Food additive, "copper chlorophyll".

スペクトルとほぼ一致する $\alpha 1$, $\alpha 2$ ピーク物質及びフェオフィチン b のそれと一致する $\beta 1$, $\beta 2$ ピーク物質が存在し、フェオフィチン類似物質が含有していることが判明した。次に、 $\alpha 1$, $\beta 1$ の各分取物質を、同様な方法により、銅金属化反応の後 HPLC 分析を行って、類似物質原料成分である確認を行った。各クロマトグラムを Fig. 3 の (II) に示したが、 $\alpha 1$,

$\beta 1$ からは、それぞれ 2 つの物質が合成された。三次元フォトダイオードアレイ検出器による吸収スペクトルは、それぞれ銅クロフィル a, b のそれと一致し、Fig. 3 の (III) に示した銅クロフィル製剤中の主要な類似物質の保持時間と一致した。したがって $\alpha 1$, $\beta 1$ 物質が求める銅クロフィル類似物質対応成分であると考えられた。まず、FAB による質量分析を行ったところ、擬分子イオンピークが、 $\alpha 1$ は m/z 888, $\beta 1$ は m/z 902 に観察され、それぞれフェオフィチン標準品より 16 マスユニット大きな結果が得られた。次に、NMR スペクトルによって構造解析を行った。フェオフィチン a 及び b のポルフィリン環上のプロトンシグナルの割付けは、文献^{5,6)}を参考に Table I のように行った。 $\alpha 1$ 分取物のスペクトルは、フェオフィチン a のそれとほぼ類似していたが、5—7 ppm 付近が異なり、これらを Fig. 4 に拡大して示した。(I) はフェオフィチン a のスペクトルであるが、2 の 2 位のアリル基のプロトンのシグナルに重なって、これらより大きな 10 位のプロトンのシグナル (6.26 ppm) が認められた。一方、 $\alpha 1$ 分取物から得られたスペクトル上には、この 10 位のプロトンのシグナルは認められず、5.53 ppm と 5.36 ppm に新たに二本ピークが検出された (II)。これらのピークは、それぞれ重水処理をすると消えたことから (III)、アルコール性水酸基が 10 位の炭素に結合しているものと考えられた。つまり、フェオフィチン a 類似物質 $\alpha 1$ の構造は、10 水酸化フェオフィチン a であると考えられた。なお、これら 2 本のピークは、 $\alpha 1$ 分取物が、10 位での立体異性体の混

TABLE I. ^1H NMR Chemical Shifts^{a)} of Pheophytins and Their Analogues

Proton	Pheophytin a	Pheophytin b	10-Hydroxy Pheophytin a	10-Hydroxy Pheophytin b
α	9.40	10.44	9.50	10.54
β	9.54	9.73	9.63	9.82
δ	8.56	8.54	8.63	8.62
10-H	6.33	6.23	—	—
10-OH	—	—	5.53	5.57
11-COOCH ₃	3.88	3.89	3.74	3.75
1-CH ₃	3.41	3.39	3.43	3.41
3-CH ₃	3.25	—	3.28	—
5-CH ₃	3.69	3.71	3.61	3.64
3-CHO	—	11.21	—	11.24
2-allyl 1-H	8.01 ($J_{1,2}^1=11.4$ Hz)	8.04 ($J_{1,2}^1=11.8$ Hz)	8.03 ($J_{1,2}^1=11.5$ Hz)	8.06 ($J_{1,2}^1=10.8$ Hz)
2-allyl 2 ¹ -H	6.19 ($J_{1,2}^2=18.7$ Hz)	6.25 ($J_{1,2}^2=17.8$ Hz)	6.19 ($J_{1,2}^2=18.6$ Hz)	6.26 ($J_{1,2}^2=17.6$ Hz)
2-allyl 2 ² -H	6.30 ($J_{2,2}^2=1.1$ Hz)	6.41 ($J_{2,2}^2=1.1$ Hz)	6.35 ($J_{2,2}^2=1.3$ Hz)	6.41 ($J_{2,2}^2=1.2$ Hz)

a) From tetramethylsilane in CDCl_3 ; ppm.

Fig. 4. NMR Spectra of Pheophytin a and Its Analogue

(I); Pheophytin a, (II); Pheophytin a analogue, (III); Pheophytin a analogue treated with deuterium oxide.

JEOL JNM-EX400 NMR spectrometer was operated at 400 MHz.

Fig. 5. Structures of Pheophytins, Copper Chlorophylls and Their Analogues in Food Additives

化合物によるためである。α 1 分取物から 2 種類の化合物が生じたのは (Fig. 3 参照), α 1 分取物が, 異性体の混合物質であったことによるものと考えられる。同様に, β 1 分取物についても解析したところ, その構造は 10 水酸化フェオフィチン b であり, 立体異性体の混合物質であると考えられた。なお, この原料中の水酸化フェオフィチンについては, Nakatani ら⁶⁾によっても蚕糞中での存在が確認されている。

類似物質の原料成分の構造解析結果と銅クロロフィル類似物質の質量分析や赤外吸収分析結果を考え合わせると, 銅クロロフィル類似物質の構造は, 10 水酸化銅クロロフィルであると考えられた。以上の結果, 製剤原料及び製剤中に含有する類似物質の構造を, まとめて Fig. 5 に示した。

3. 銅クロロフィル類似物質の生成要因

原料中に混在するフェオフィチン類似物質が, 製剤や食品中の銅クロロフィル類似物質の含有量に大きく関与していると考えられた。そこで, フェオフィチン類似物質生成要因の検討を行った。

クロロフィル様化合物は, アルコール溶液中では, アロメリ化 (allomerization) と呼ばれる自動酸化を受けやすいことが知られている。^{5,7)} そこでフェオフィチンのアロメリ化実験を行った。フェオフィチン a の 10 μg/ml 濃度のメタノール溶液を, 40 日間, 25°C で暗室中に放置したところ, 10 水酸化フェオフィチン a (α 1) と考えられるピークが新たに生成した。一方, 同条件で, アセトン溶液中では水酸化

フェオフィチンの生成はみられなかった。つまり, アルコール等のプロテックな溶液との長時間の接触が, 類似物質生成に関与していると考えられる。このほか, 植物の酵素や蚕代謝系の関与も考えられる。^{5,6)}

Fig. 1 に示したチューインガム製品のクロマトグラムから, 公定方法による銅クロロフィル含有量は, ほとんどすべてが類似物質量と考えられる。また, 市販製剤も同様である。現在のところこれら銅クロロフィル酸化体の毒性は明らかではないが, 本製剤が公定書の規格に合致していることも考え合わせると, 銅クロロフィル標準品や類似物質の毒性の検討, さらに食品添加物規格基準や使用基準の再検討も必要であると考えられる。

結 論

市販の銅クロロフィル含有表示のチューインガム製品から, 複数の銅クロロフィル類似物質を検出した。機器分析結果から, 主成分の構造は, 10-水酸化銅クロロフィルと推定された。この類似物質は, チューインガム製品製造中に添加された市販の食品添加物用銅クロロフィル製剤からも検出された。製剤由来物質と考えられた 10-水酸化銅クロロフィルは, 製剤原料中のフェオフィチンが製造あるいは保管中にアロメリ化反応等の酸化を受けて生じた 10-水酸化フェオフィチンとの銅金属化反応によって生成した可能性が示唆された。

引用文献

- 1) 平成5年4月21日付厚生省生活衛生局長通知衛化第40号.
- 2) 大戸幹也, 松永明信, 山本 敦, 水上英一, 富山県衛生研究所年報, **15**, 134 (1992).
- 3) H. Inoue, K. Furuya, K. Watanabe, K. Tanaka, T. Shirai, E. Miyoshi, *Anal. Sci.*, **4**, 599 (1988).
- 4) 厚生省食品化学課編, “食品中の食品添加物分析法,” 1988, p.174.
- 5) F.C. Pennington, H.H. Strain, W.A. Svec, J.J. Katz, *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 3875 (1967).
- 6) Y. Nakatani, G. Ourisson, J.P. Beck, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2261 (1981).
- 7) L.G. Johnston, W.F. Watson, *J. Chem. Soc.*, 1203 (1956).