塩漬け大根中の β -カルボリン骨格を有する 黄色色素の生成とその性質

小沢好夫*・宇田 靖**・川岸舜朗***

Formation of Yellow Pigment Containing a β -Carboline Skeleton in Salted Radish Roots and its Properties

Yoshio OZAWA*, Yasushi UDA** and Shunro KAWAKISHI***

* Gunma Women's Junior College, Nakaorui-cho, Takasaki 370

** Department of Agricultural Chemistry, Utsunomiya
University, Mine-cho, Utsunomiya 321

*** Department of Food Science and Technology, Nagoya
University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01

The presence of a yellow pigment containing a β -carboline derived from 1-(2'-pyrrolidinethion-3'-yl)-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (PTCC) was investigated in salted radish roots. PTCC spotted onto silica gel plates was allowed to stand for five days at 40°C, resulting in the generation of yellow pigments. The methanol extract was subjected to Toyopearl HW-40 S column chromatography using methanol as an eluent. The major peak was concentrated to give a yellow powder. The UV, IR and NMR spectra showed that the yellow compound had a β -carboline moiety derived from PTCC by its decarboxylation. On the other hand, yellow pigments extracted from salted radish roots were fractionated on a Sephadex LH-20 column using 50% methanol as an eluent. Among three fractions, the main yellow fraction was isolated and analyzed by paper chromatography, UV and IR spectroscopy. These data showed that the yellow pigment was similar to those of yellow pigment derived from PTCC. Thus, it was confirmed that PTCC contributed to the development of a bright yellow pigment in salted radish roots. Effect of light resistance on the pigment was similar to that of curcumin. However, the color of the pigment was slightly turned to a brown with 1 mM ferrous ion. Also, the pigment exhibited no mutagenic activity to *S. typhimurium* TA 98 and TA 100 with and without S-9 mixture.

(Received Oct. 31, 1991)

ダイコンを塩漬けにすると徐々に鮮黄色を呈することが知られている。たくあんを黄色に着色することはこの色を強調するためである。

著者らはこれまでに、この鮮黄色色素の生成にはダイコン中の主要な辛味成分である 4-メチルチオ-3-ブテニルイソチオシアナート (4-MTBI) が必須成分であり¹⁾、

さらにこのイソチオシアナートはアスコルビン酸やカテコールなどと反応し、黄色色素を生成することを報告した²⁾。また塩漬け大根中から室温下にて放置することにより徐々に鮮黄色に移行する化合物として、1-(2'-ピロリジンチオン-3'-イル)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロ- β -カルボリン-3-カルボン酸 (PTCC) の存在を報告し

* 群馬女子短期大学 (〒370 高崎市中大類町 501)

** 宇都宮大学農学部 (〒321 宇都宮市峰町 350)

*** 名古屋大学農学部 (〒464-01 名古屋市千種区不老町)

た³⁾。この PTCC は黄色色素の前駆物質と考えられ、L-トリプトファンと 4-MTBI の分解産物である 2-チオキソ-3-ピロリジンカルバルデヒドから非酵素的に生成することを明らかにした⁴⁾⁵⁾。一方ダイコンからたくあんに至る過程では褐変物質も生成することが報告されている⁶⁾。以上のように塩漬大根の貯蔵中に生成する黄色も複雑な構成になっていることが示唆される。しかし、鮮黄色に限ってみると、PTCC 由来の黄色色素の関与が重要であると考えられた。

これまでに黄色に変色した塩漬大根中に β -カルボリン骨格を有する色素の存在を明らかにした報告は見られない。そこで今回は塩漬大根黄色色素中に β -カルボリン骨格の存在を明らかにするとともに、PTCC から調製した黄色色素を用いて、光及び金属イオンの影響、並びに変異原性についても検討したので報告する。

実験方法

1. PTCC の調製と色素の生成

(1) PTCC の調製

PTCC は既報⁵⁾に準じ、新鮮なダイコンから抽出し、精製した 4-MTBI と L-トリプトファンより合成し、メタノールで平衡化したトヨパール HW-40 S カラム (3×55 cm) を用いて精製した。そして UV, IR 及び NMR スペクトルにより同定した。

(2) 黄色色素の調製

200 mg の PTCC を 50 ml の熱メタノールに溶解し、TLC (Merck, silica gel 60 G) 上にスポットし、40℃の恒温器中に 5 日間放置し、黄色色素を生成させた。これを熱メタノールにより抽出し、トヨパール HW-40 S カラム (3×40 cm) により精製した。

2. 塩漬大根から鮮黄色色素の抽出と分画

実験に用いた塩漬大根は、漬け込み後約 8 か月間経たものを、群馬県下の工場より入手した。

3 kg の試料に対し 3 倍量のメタノールを用いてホモゲナイズし、室温下で 48 時間抽出した。抽出液を 40℃以下で減圧濃縮し、エーテルで脱脂した後、凍結乾燥した。この一部を 10 ml のメタノールに溶解し、析出する塩類を遠心分離により除いたものを粗色素液とした。この色素液を 50% メタノールで平衡化した Sephadex LH-20 のカラム (3×60 cm) に添加し、50% メタノール溶液を用いることにより色素の分画を行なった。そして溶出液を 5 ml ずつ分取し、400 nm の吸光度を測定した。

3. PTCC から生成した黄色色素の諸性質

1-(2) で得た色素を用い、その安定性に及ぼす光、鉄及び銅イオン並びに変異原性について検討した。

(1) 光照射の影響

2 mg の色素を 100 ml のメタノールに溶解し、その溶液 10 ml を試験管 (1.5×15 cm) に入れ、これを 500 W のタングステンランプで 25 cm の距離から照射した。対照としてたくあんの着色に多く使用されているクルクミン 4 mg を、500 ml のメタノールに溶解したものを、用いて同様に処理し、経時的に 410 nm (供試色素) と 420 nm (クルクミン) の吸光度を測定した。

(2) 金属イオンの影響

鉄と銅イオンの影響について検討した。pH 6.8 の McIlvaine 緩衝液 100 ml に 2 mg の色素を溶解し、この溶液を 4 ml ずつ 2 本の試験管に入れた。これに 1 mM 硫酸第一鉄溶液 1 ml 添加し、他方は 1 mM 硫酸銅溶液 1 ml を加え、全量を 5 ml とし、それぞれの UV スペクトルを測定した。

(3) 変異原性試験

色素の変異原性の有無を知るために、矢作らの改変 Ames 法⁷⁾による試験を行なった。テスト菌は *Salmonella typhimurium* TA 98 及び TA 100 を用い、S-9 mix (オリエンタル酵母(株)製) 無添加及び添加区について実施した。試験は、対照区 (ジメチルスルフォキシド)、試験区とも 2 枚のプレートを用いて行なった。

4. 機器分析

UV、可視吸収スペクトルは島津 UV-160 分光光度計を用いて測定した。赤外吸収スペクトルは Beckman AccuLab-1 型を用い、KBr 法により測定した。NMR スペクトルは Varian VXR-300 型を用い、内部標準物質としてテトラメチルシランを使用し、ジメチルスルフォキシド中で測定した。高速液体クロマトグラフィーは島津 LC-5 A 型を用い、カラムは信和化工製 ULTRONC₁₈ (10×250 mm) を使用した。

結果及び考察

1. PTCC から調製した色素の単離と構造

塩漬大根中に PTCC 由来の黄色色素の存在を確認するのに先立ち、PTCC から黄色色素を調製し、その UV, IR 及び NMR スペクトルを測定した。

TLC 上で生成した黄色色素を熱メタノールで抽出したのち、メタノールを溶出液とするトヨパール HW-40 S カラムで分別することにより 6 個の色素のバンドを得た。これらの中で最も鮮黄色を呈するバンドは 450 ml

Fig. 1 Paper chromatograms of yellow pigments obtained from PTCC and salted radish roots

Solvent system; n-butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 2

A ; yellow pigment derived from PTCC

B ; yellow pigment extracted from salted radish roots

The yellow pigments of salted radish roots were separated into three fractions by Sephadex LH-20 column chromatography, using 50% methanol solution as an eluent. Among of them, the bright yellow fraction was rechromatographed by same chromatographic conditions ; as a result, major (F-1) and minor fractions (F-2) were obtained.

付近から 515 ml までの間に溶出した。Fig. 1 A に示すようにペーパークロマトグラフィー (n-ブタノール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 2) により、この画分中には Rf 値 0.35 (1) 及び Rf 値 0.45 (2) を有する 2 個の鮮黄色色素が存在することが示された。両色素の割合は HPLC により 9 : 1 であった。さらに精製するためペーパークロマトグラフィーにより分離することを試みたが、精製中に色素 (1) から色素 (2) への移行が認められた。このことから両者は類似した構造であることが推察された。そこで色素 (1) と (2) の混合物として、そのメタノール/エーテル溶液から約 15 mg の鮮黄色色素を得た。これを以下の機器分析に供試した。

この色素の UV スペクトルは Fig. 2 に示すように $[\lambda_{\max} (\text{MeOH}) \text{ nm } 270, 290, 380, 410]$ に吸収極大を示した。これは β -カルボリン骨格の特徴を示していた³⁾⁸⁾。IR スペクトルは Fig. 3 に示した。3450 cm^{-1} の吸収はアミノ基、740 cm^{-1} の吸収はインドール環の

Fig. 2 UV spectra of the yellow pigments obtained from PTCC and salted radish roots

(1) yellow pigment derived from PTCC

(2) yellow pigment extracted from salted radish roots (F-1)*

(3) yellow pigment extracted from salted radish roots (F-2)*

* See footnote in Fig. 1

Fig. 3 IR spectra of the yellow pigment (1) derived from PTCC and F-1 (2) fraction obtained from salted radish roots

イミノ基⁹⁾によると考えられた。¹H-NMR スペクトルは芳香属領域に以下のシグナルを示した。 δ 8.10 (1H, d, $J=5.0$ Hz), 7.68 (1H, d, $J=5.0$ Hz), 7.50 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 7.20 (1H, t, $J=7.5$ Hz), 7.09 (1H, t, $J=7.5$ Hz), 7.50 (1H, d, $J=8.1$ Hz)。これらのデータは β -カルボリン骨格の特徴を示していた¹⁰⁾。また ¹³C-NMR スペクトルは芳香属領域に以下のシグナルを示した。 δ 137.77, 136.88, 135.94, 131.88,

Fig. 4 Proposed pathway for the formation of yellow pigment containing β -carboline derived from PTCC
(1) PTCC (2) Aromatized products

127.59, 126.61, 123.00, 121.07, 119.18, 119.13, 111.79. そして PTCC³⁾ のそれと比較し、カルボキシル基炭素 (δ 173.90) に帰属されるシグナルが消失していた。これらの結果から、Fig. 4 に示すように PTCC の脱炭酸による芳香族化により β -カルボリン誘導体が生成したものと考えられた¹¹⁾。さらにこの鮮黄色色素をメタノールを溶出溶媒としてセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーにより精製を行なうと色素は変色し、新たに 3 種の蛍光を呈する化合物に移行することをペーパークロマトグラフィーにより明らかにした。これらの化合物の一つは 1-(4'-アミノ-3'-ブテナール-2'-イル)- β -カルボリン (ABC) であると同定された¹²⁾。

以上のように PTCC から生成する鮮黄色色素は ABC と他の未同定の化合物から構成されていると考えられた¹²⁾⁻¹⁴⁾。

2. 塩漬大根黄色色素の分離と PTCC 由来色素 (1) との比較

次に、PTCC 由来の鮮黄色色素が実際に塩漬大根中に存在するかどうかを確認する検討を行った。

塩漬大根抽出液の凍結乾燥した試料をメタノールに溶解すると、次第に多量の塩類が析出し、色素はほとんどメタノールに溶解した。このことから色素は比較的低分子化合物より構成されていると考えられた。Fig. 5 は塩漬大根から得られた色素の Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによる溶出パターンである。3 個のピークに分かれ、ピーク 1, 2 は黄褐色であり、それらの UV 吸収スペクトルはいずれも吸収極大を有さず、250 nm の短波長側に強い吸収を示し、長波長側に移行するのに従い次第に吸収は低下した。ピーク 3 は鮮黄色を呈しており、この画分はアンスロン-硫酸反応陽性物質は存在しなかったことから、糖の混入は認められなかった。さらに 3 の画分を精製するために同一カラムで再

Fig. 5 Gel chromatogram of the yellow extract from salted radish roots
The separation was done on a Sephadex LH-20 column (3 × 60 cm) using methanol as an eluent, and the eluate was monitored at 400 nm.

クロマトグラフィーを行なった。その結果 2 個のピークに分かれ、溶出する順にそれらの画分を F-1, F-2 とした。Fig. 1 B にこれらフラクションのペーパークロマトグラム (n-ブタノール：酢酸：水=4:1:2) を示した。F-1 から Rf 値 0.35 と 0.45 を有する鮮黄色のスポットが現われた。これらの Rf 値とスポットの出現パターンは PTCC のそれとよく一致していた。F-2 からは Rf 値 0.35 に UV 下ブルーの蛍光を呈するスポット、0.45 と 0.75 付近に淡黄色のスポットが存在した。そしてこの F-1 画分を凍結乾燥することにより約 2 mg の鮮黄色色素を得た。一方、F-2 画分は量が少なく単離することができなかった。Fig. 2 は F-1 及び F-2 の UV 吸収スペクトルを示したものである。両者の吸収極大は F-1 [$\lambda_{\max}$ (MeOH) nm 270, 290, 380], F-2 [$\lambda_{\max}$ (MeOH) nm 270, 290, 350] であった。これらのスペクトルは β -カルボリン骨格の特徴^{3,8)} である 270, 290 nm に吸収極大を有しており、なかでも F-1 は PTCC からの鮮黄色色素のそれと良く類似していた。Fig. 3 にその IR スペクトルを示した。この色素は 3450 cm^{-1} にアミノ基による吸収と、 740 cm^{-1} にインドール環のイミノ基⁹⁾ によると考えられる吸収が存在した。さらにスペクトルの吸収パターンは PTCC からの鮮黄色色素のそれとよく一致していた。これらの結果から塩漬大根から得られた鮮黄色色素は β -カルボリン骨格を有し、塩蔵中に PTCC から生成したことが明らかとなった。さらにこの F-1 画分の精製を行なう

Fig. 6 Effects of visible light on the stabilities of yellow pigment derived from PTCC and curcumin

●: Yellow pigment derived from PTCC in methanol, absorption at 410 nm

○: Curcumin in methanol, absorption at 420 nm

Both solutions in test tube (1.5×15 cm) were irradiated by tungsten lamp at a distance of 25 cm.

と、PTCC 由来色素 (1) 同様に変色することが認められた。

以上のことから塩漬け大根中には黄色を呈する物質は褐変物質を含め、複雑な成分から構成されていると考えられるが、鮮黄色への寄与という点では PTCC から生成する β -カルボリン骨格を有する色素が重要な役割を果たしていると考えられた。

3. PTCC から調製した鮮黄色色素の性質

塩漬け大根から単離した色素は微量しか得られなかったため、PTCC から Silica gel plate 上で調製した色素を使用した。

(1) 光照射及び金属の影響

Fig. 6 に光照射の結果を示した。色素の光に対する安定性は対照として用いたクルクミンとほぼ同一であった。さらに金属イオンの影響を検討するために、食品の着色に影響を及ぼすことが知られている¹⁵⁾¹⁶⁾鉄 (II) と銅 (II) を添加した結果を Fig. 7 に示した。鉄 (II) を添加した区の色調はやや褐色を帯びており、その UV スペクトルは吸収極大が消失していた。一方銅 (II) を添加した区では 300 nm 付近の吸収が増大していた。これらの溶液に EDTA を加えてもスペクトルに変化は生じなかった。

(2) 変異原試験

Fig. 7 Effects of metal ions on UV spectra of the yellow pigment derived from PTCC

(1) Added with 1 mM ferrous ion (final conc., 0.2 mM)

(2) Added with 1 mM cupric ion (final conc., 0.2 mM)

Table 1 Mutagenicity of the yellow pigment derived from PTCC for *S. typhimurium* TA 98 and TA 100

Dose (μ g/plate)	Number of revertants			
	TA-98		TA-100	
	+S9	-S9	+S9	-S9
125	30	17	124	138
250	14	29	132	149
500	15	11	137	128
Control (DMSO)	8	10	107	160

カルボリン骨格を持つ Trp-P-1, Trp-P-2 などは変異原活性を示すことが知られているため¹¹⁾、安全性についての試験を行なった。その結果を Table 1 に示した。*S. typhimurium* TA 98 及び TA 100 に対し、S-9 mix 無添加及び添加両区においてコントロールとの有意な差及び濃度依存性は認められなかった。したがって変異原活性は有しないと考えられた。

要 約

PTCC のメタノール溶液を Silica gel plate 上にスポットし、5 日間放置することにより生成する黄色色素は脱炭酸を伴う芳香族化により生成した β -カルボリン骨格を有することが明らかとなった。

一方塩漬け大根より抽出した粗色素液は Sephadex

LH-20 カラムクロマトグラフィーを用いることにより 3 画分に分かれた。このうち一つの画分は鮮黄色を呈しており、再クロマトグラフィーにより F-1 [$\lambda_{\max}$ (MeOH) nm 270, 290, 380], F-2 [$\lambda_{\max}$ (MeOH) nm 270, 290, 350] の 2 個のフラクションに分かれた。F-1 は PTCC 由来の鮮黄色色素とよく一致しており、 β -カルボリン骨格を有することが明らかとなった。

PTCC から調製した鮮黄色色素は、鉄 (II) 及び銅 (II) などの金属イオンに影響された。また変異原活性は有しないと考えられた。

文 献

- 1) 前田安彦・小沢好夫・宇田 靖：日食工誌, **29**, 522 (1982).
- 2) OZAWA, Y., UDA, Y., OHSHIMA, T., SAITO, K. and MAEDA, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 605 (1990).
- 3) OZAWA, Y., KAWAKISHI, S., UDA, Y. and MAEDA, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1241 (1990).
- 4) UDA, Y., OZAWA, Y., OHSHIMA, T. and KAWAKISHI, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 613 (1990).
- 5) OZAWA, Y., UDA, Y. and KAWAKISHI, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1849 (1990).
- 6) 宇田 靖・小沢好夫・前田安彦：日本栄養・食糧学会講演要旨集, p. 123, 東京 (1973).
- 7) YAHAGI, T., NAGAO, M., SEINO, Y., MATSUSHIMA, T., SUGIMURA, Y. and OKADA, M.: *Mutation, Res.*, **48**, 121 (1977).
- 8) SAKAI, R. and HIGA, T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6408 (1986).
- 9) The Aldrich Library of Infrared Spectra, 2nd ed., ed. by POUCHERT, C.G. (Aldrich Chemical Co., Milwaukee), p. 1082 (1975).
- 10) AGUIAR, L.M.G., FILHO, R.S., GOTTLIED, O.R., MAIA, J.G.S., PINHO, S.L.V. and DE SOUSA, J.R.: *Phytochemistry*, **19**, 1859 (1980).
- 11) FRIEDMAN, M. and CUQ, J.L.: *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1987 (1988).
- 12) OZAWA, Y., UDA, Y. and KAWAKISHI, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 144 (1992).
- 13) 斉藤規夫：植物色素, 林 孝三編 (養賢堂, 東京) p. 268 (1980).
- 14) 中林敏郎・山田恭吏：日食工誌, **34**, 211 (1987).
- 15) 橋場弘長・越山 育・坂口健二・井口信義：農化, **44**, 312 (1970).
- 16) 近藤竜雄：食衛誌, **7**, 331 (1966).

(平成 3 年 10 月 31 日受理)