

食品中における香辛料フェノール成分の動態解析

増田 俊 哉 ・ 山 口 英 昌*

(徳島大学総合科学部助教授, 大阪市立大学生活科学部教授*)

1. はじめに

香辛料は天然の食品添加物であり、その機能が古くから利用されてきたが、最近、香辛料には数多くの有用活性フェノール成分が含まれ、それらが香辛料自体の食品保蔵等の機能発現に重要であることが示唆されている。しかしながら、それらの有用なフェノールが実際食品のなかでどのように作用し、変化するか、すなわち動態については、実際の香辛料の機能を考える上で重要にも関わらず現在それほど知られていない。香辛料が食品保蔵の目的で使われる限り、長期にわたって食品の重要栄養成分と共存し、保存中の外部からの影響（光、熱、酸素等）により栄養成分とともに変化していく。本研究では、食品の劣化の一つである酸化がラジカルによる反応であること、さらに多くの香辛料フェノールがラジカル除去作用を有しその機能を発現していることを考慮し、香辛料フェノールのラジカルによる生成物に焦点をおき、それらの化学構造や生成機構を推定することにより香辛料フェノールの動態を解析するための知見を蓄積する。さらに、共存する脂質、蛋白質などの食品栄養成分との相関反応物にも検討を加え、天然食品添加物としての香辛料の有効利用に貢献することを最終目的としている。

今回、香辛料フェノールとして取り上げたのはクルクミンである。クルクミンは香辛料であり薬草でもあるウコン（半加工品がターメリック）の主要黄色色素成分として知られている¹⁾。また、クルクミン単独も食用色素として市販もされてお

り、たくわん漬けやマスタードの着色によく使用されている。また、カレーの黄色は主にこのクルクミンの色でもある。クルクミン構造を有するフェノール（クルクミノイド）には、これまで、メトキシ基の少ない2種の物質のみが知られていたが、最近になって、メトキシ基の多いもの、または、炭素骨格の伸びた複合型クルクミンが、ウコン類縁の熱帯産ショウガ科植物に広く存在することを、我々は明らかにしている（Fig.1）²⁾。また、クルクミン構造の違いでその抗酸化性をはじめとする有用機能が変化することも確認しており、今後の利用が期待される。このようなクルクミノイド系フェノールの母核・クルクミンについて食品化学的立場から数多くの知見を得ることは重要である。

Fig.2 にはラジカルの脂質の酸化劣敗と抗酸化抑制機構をあげた³⁾。仮に食品において酸化的劣敗がおこりつつあるとする。その際、食品栄養成分にはラジカルが生じ、それがすぐに酸素によっ

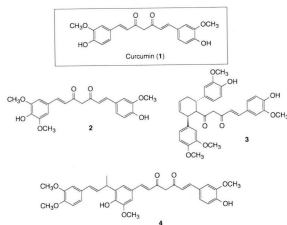


Fig.1 Chemical Structures of Curcumin and Related Compounds

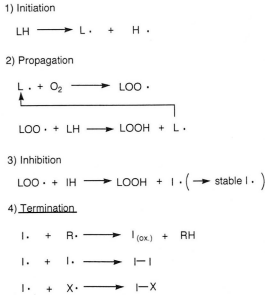


Fig.2 Radical Oxidation and Inhibition Mechanism of Food Lipid

で酸化される。酸化物はまだラジカルであり、さらに食品成分をラジカル連鎖的に酸化していく。一方、食品栄養成分よりラジカルと親和性の高いもの (IH) が存在すれば、そのものがラジカルとなり、それ以上食品栄養成分が酸化されることはない。一般に、この化合物は抗酸化剤といわれ、より安定なラジカル物質となるものほど効果的と言われている。しかしながら、安定とはいえ、所詮ラジカルであり、いつかはラジカル消去をしな

ければならない。従って Fig.2 の 4) のように化合物が酸化されるか、もう一つのラジカル化合物とカップリングするか、また、何らかのラジカルと反応してラジカル反応が収束していくと考えられる。すなわち、いずれの場合にも化合物 IH は変化する。抗酸化機能を有する香辛料フェノールはまさしく IH に相当し、その変化に関わる最終過程は食品成分の変化を物質から解析するのに最も重要かつ有効と考えられ、クルクミンに関して以下研究を進めた。

2. ラジカル条件下でのクルクミン単独の変化の解析

クルクミンが効率よくラジカルを捕捉し、消去することはよく知られているが、どのように消去していくかは不明である。そこで、クルクミンをラジカル種と反応させ、その変化を調べることにした。ラジカル種を発生させる物質として、比較的安定で取り扱いが容易であるアゾ系化合物・AIBN [2,2'-azobis (isobutyronitrile)] を選択した。なお、クルクミンは、市販のクルクミンは純粋ではなく、ラジカル反応の再現性がないことから Pabon の方法⁴⁾により合成し、精製したも

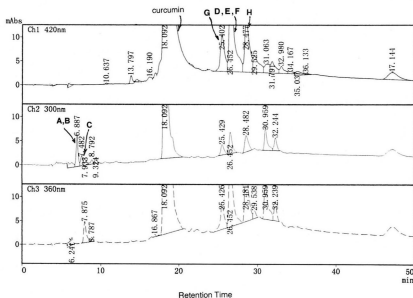


Fig.3 HPLC Analytical Data of Reaction with Curcumin and AIBN (2hr)

のを用いた。反応は、クルクミン100mgとAIBN 100mgを5mlのアセトニトリルに溶解し、系を脱気、酸素置換の後、酸素存在下70°Cに加熱して行った。この条件下では、AIBNは熱分解し、生じた炭素ラジカルはまず酸素と反応して、脂質酸化の中間体同様のパーオキシラジカルを生じ、これがクルクミンと反応するものと思われる⁹⁾。反応のモニターは計時的に反応液を10 μ l採取し、アセトニトリル100 μ lで希釈したものを、3 μ l HPLCにて分析することにより行った。使用したHPLCの条件は以下のとおりである。

Column: DevelosilCN-5 (4.6 $\times$ 250mm), Soxvent: A) 2% AcOH in EtOAc, B) 2% AcOH in Hexane, 50分間でA液が14%を71%にリニアグラデュエント, Flow Rate: 1ml/min, Detection: 420nm, 360nm, 300nmでピーク部のみ250nmから500nmまでのスペクトル採取。反応開始1時間後のデータをFig.3に示した。この反応時間においては、保持時間18分に未反応クルクミンが観察されるが、それ以外にクルクミンから変化した物質と思われるピークが数多く観察される。そのうち、特徴的な420nm検出における25分ピーク、26分ピーク、28分ピーク、ならびに、300nm検出における6分ピーク、7分ピークに着目した。なお、それぞれのピークは、後に明らかとなった含有物質より、G (25分), D, E, F (26分), H (28分), A, B (6分), C (7分)とした。これらのピークの強度の時間経過をFig.4にまとめた。HPLCでクルクミンより遅く検出されるピークG, D, E, F, Hはいずれも、反応2時間までは急速に生成し、その後徐々に減少していくことがわかった。なお、420nm検出においては、これらのピークは7時間後までには完全になくなり、それ以外のピークは生ずることがなかった。従って、ピークに該当する化合物は、反応の初期に生成する物質であり、この物質を経

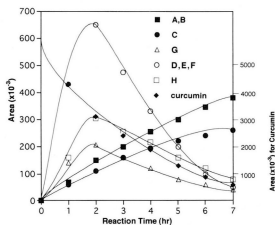


Fig.4 Time Course of Curcumin and Reaction Products

由して複雑なラジカル反応を経て、各種の分解物を与えるものと考えられた。一方、300nmで検出できるA, B, Cピークは生成速度は低いものの、反応の初期から確実に蓄積され、7時間後もなくなることはなく、相当する化合物は反応条件に比較的安定な生成物と思われた。しかしながら、いずれも、クルクミン本来のUV-VIS吸収である420nmの吸光を持たず、フラグメント化した物質であることが予想できた。

3. 化合物の単離と化学構造

続いて、実際の化合物の単離を試み、その化学構造に関する知見を得ることにより、クルクミンのラジカル的変化の詳細の解析を試みることにした。反応は、一回あたりクルクミン1gを用いて同様に酸素下で行い、時間は、D~Hの生成量が最大となる2時間に設定した。反応液を冷却後、減圧下、室温でアセトニトリルを溜去したものを、メタノールによる結晶化により、未反応のクルクミンを除いた。母液を含メタノール溶媒に特性を持つNAM型シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーを行い、8個のフラクションを得た。そのうち、フラクション2より、さらに精製操作を行うことにより、化合物AとBを、フラクション4よりMPLCを用いて化合物Gを、フラクシ

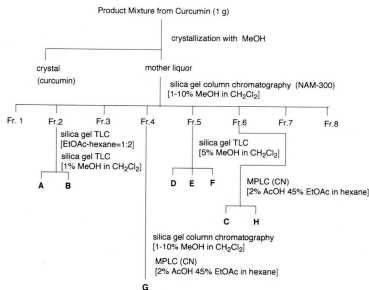


Fig.5 Isolation Scheme for Compounds A~H

ョン5より化合物D, E, Fを、フラクション6より化合物CとHを単離することができた (Fig. 5)。単離した化合物については、それぞれHPLC分析を行い、その保持時間より、Fig.3のHPLCチャート上のそれぞれのピークに相当する事を確認した。単離した化合物の化学構造はおもにNMRを中心にしたスペクトル分析により行った。その結果、化合物Aはジケトン性物質、Bはバニリン、Cはフェルラ酸と決定した (Fig. 6)。以下にNMRデータとMSデータを示した。

A : $^1\text{H-NMR}$ δ 7.68 (1H, d, $J=16\text{Hz}$), 7.45 (1H, d, $J=2\text{Hz}$), 7.29 (1H, d, $J=8$ and 2Hz), 7.02 (1H, d, $J=8\text{Hz}$), 6.73 (1H, d, $J=16\text{Hz}$), 5.92 (1H, brs), 4.05 (3H, s), 2.26 (3H, s); EI-MS m/z 234 (M^+)。

B : $^1\text{H-NMR}$ δ 9.97 (1H, s), 7.60 (2H, m), 7.36 (1H, d, $J=8\text{Hz}$), 4.10 (3H, s); EI-MS m/z 152 (M^+)。

C : $^1\text{H-NMR}$ δ 7.73 (1H, d, $J=16\text{Hz}$), 7.46 (1H, d, $J=2\text{Hz}$), 7.28 (1H, dd, $J=8$ and 2Hz), 7.02 (1H, d, $J=8\text{Hz}$), 6.52 (1H, d, $J=16\text{Hz}$), 4.08 (3H, s); EI-MS m/z 194 (M^+)。

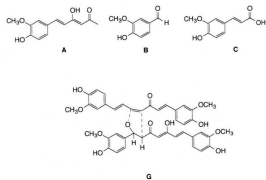


Fig.6 Chemical Structures of Compounds A, B, C and G

一方、化合物DからHについては、いずれも、NMRにおいて非常に複雑かブロードなシグナルデータを示した。そこで、最も量的に確保できた化合物Gに2DNMR手法を用いた検討を加えた。 $^1\text{H-NMR}$ およびHH-COSYスペクトルによると4つの3置換ベンゼン、3つのトランス置換オレフィン、およびグリコール構造の存在が示唆された。また $^{13}\text{C-NMR}$ においては2つの共役カルボニル炭素、および1つのカルボニル炭素の存在が示唆された。それらの部分構造を連結すべく、HMQC, HMBCならびにNOESYスペクトルを測定しFig.6に示すような推定構造を導き出した。しかしながら、完全な結合を証明するには至

っていない。また、各種イオン化法を用いた MS においても分子イオンと思われるピークを得ておらず、最終構造は現在検討中である*。他の化合物 D, E, F, H においてもその¹H-NMR データは G に類似していることから類縁体であろうと考えられる。一方、GPC 法により分子量の大きな値を測定したところ、いずれも約700強であり、クルクミンが2分子程度の同分子間反応物であろうと考えられた。以上総合すると、クルクミンはラジカルと反応し（これまでの研究結果からまずフェノール部分で反応していると思われる）、そのラジカルがアルキル部分に転移後、さらに別のクルクミンないしはクルクミンラジカルと反応し、2量体ないしはそれ以上となってラジカル反応を終結するか、または、クルクミンラジカルがアルキル部分において酸素と反応し、酸化的分解をおこすことにより反応を終結するものと考えられた。

4. 食品成分共存下でのクルクミンの反応

クルクミンラジカルはクルクミンないしは酸素と反応して消去していく事はわかった。ところで、そのような反応が実際の食品のなかでもおきているのであろうか。そこで、次に、最も酸化に敏感な脂質が共存した状態でのクルクミンのラジカル変化を見ることにした。脂質は後の取り扱い安さを考慮して、リノール酸のメチルエステルを用いた。反応は、クルクミンが実際抗酸化力を示す最低濃度であるクルクミン0.5mM、リノール酸メチル450mMのアセトニトリル溶液を用いた。なお、温度も実際の温度として40°Cで行った。この条件で反応を進行させるために、245mMのAIBNを用いた。その反応の2時間後の HPLC 分析データ（検出360nm）を Fig.7 に示した。ク

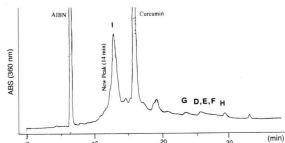


Fig.7 HPL Analytical Data of Curcumin and AIBN in the Presence of Methyl Linoleate

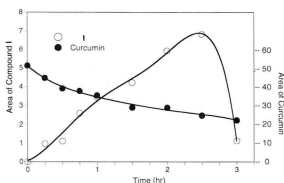


Fig.8 Time Course of Compound I Production

ルクミンのみの反応と同様に、化合物 D-H の生声成が観察されるが、それ以外に特徴的に保持時間14分に大きなピークが観察された。このピークの UV-VIS スペクトルは406nm 付近に最大吸光を持つことから黄色物質であり、脂質のみの由来ではなく、クルクミン由来の化合物と推定された。また、保持時間的は化合物より小さく、化合物の極性がなくなっていることから、共存する脂質との交差反応物であることが十分に考えられた。この化合物（化合物 I）ピークは、2.5時間を生成最大として急速に消滅する物質であり、反応の初期段階に生じたものと考えられた。(Fig.8)

5. 交差反応化合物 I の単離

化合物 I が脂質と反応したクルクミンラジカル由来のものか、実際単離して確かめることにした。反応条件上、反応液には、クルクミンに比して大量の脂質と AIBN が存在し、かつ化合物 I が室

*その後の検討により G の構造は正しいことが判明した

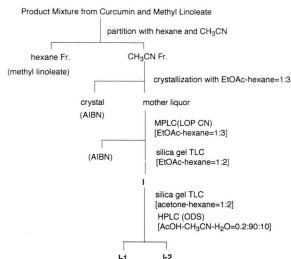


Fig.9 Isolation Scheme for Compounds I-1 and I-2

温においても時間とともになくなっていくことから（さらにラジカル反応が進んでしまうからと思われる）その単離は困難を窮めた。幸いなことに、反応アセトニトリル溶液に直接 n-hexane を加えることによりほとんどの脂質を除くことができ、さらに続けて、結晶化とシアノの中圧カラムを通すことにより過剰の AIBN が除けることがわかり、その後は比較的安定に扱えるようになった。最終的に、シリカゲルの TLC と ODS カラムを用いた HPLC により I ピークに相当する 2 つの化合物 I-1 と I-2 を単離した。しかしながら単離できた量は非常に微量であり、 $^1\text{H-NMR}$ からクルクミン由来と思われるシグナルと脂質由来と思われるシグナルを検出し、I-1, I-2 とも非常によく似た化合物であることを確認したがそれ以上の解析は困難であった。一方、MS スペクトルの測定には成功し、低イオン化電圧条件においていずれも 692 の分子イオンと思われるピークを観察した。この分子量は、クルクミンおよびリノール酸メチル、ならびに酸素 1 分子が結合したものと

に相当し、クルクミンと脂質が酸化的に反応したもの と推定された。これらの物質の完全な構造の確定は検討中であるが、すくなくとも、食品中のクルクミンの変化を考える場合には、周りの食品栄養成分との反応もクルクミンのみからの生成物質に加え、十分に考慮すべきと考えられた。

6. おわりに

残されたクルクミン反応生成物の構造の完全解明を目指すとともに、他の食品栄養成分との反応解析、また、実際の食品中での解析を進める予定である。さらに、今後はクルクミン反応物の安全性等の検討も必要となると思われる。また、その他の香辛料フェノールについて同様な検討を行っていかなければならないと考えている。

本研究遂行に関し、研究助成を賜りました浦上理事長をはじめ浦上財団の皆様にご心より感謝いたし、財団のますますのご発展を祈念いたします。また、この研究を卒業研究として実際遂行してくれました大阪市立大学生活科学部・飛高佳代さん、徳島大学総合科学部・篠原あゆみさんに感謝いたします。

文 献

- 1) V. S. Govindarajan, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* pp.199-249 (1980)
- 2) T. Masuda, *Spice: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*, pp.219-233 (1997)
- 3) 並木満夫, 松下雪郎, 食品成分の相互作用, pp.185-200 (1980)
- 4) H. J. J. Pabon, *Trav. Chim. Pays-Bas.*, 83, 379-385 (1964)
- 5) D. C. Lhebler, P. F. Baker, and K. L. Kaysen, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 6995-700 (1990)

Dynamic Analysis on Chemical Conversion of a Spice Phenol (Curcumin) in Food Model System

Toshiya Masuda and Hidemasa Yamaguchi*

(Faculty of Integrated Arts and Sciences, University of Tokushima and Faculty of Human Life Science, Osaka City University*)

Spice is well known to be rich in phenolic compounds. Some phenols can trap harmful radical which generate not only in food but also in living cells. This trapping reaction converts these phenols into phenolic radical materials. The radical species should be disappeared finally by such as radical radical coupling reaction and radical oxidation. It should be noted that the chemical structures of the phenols are modified in this process. Analysis of the chemical conversion of the phenols would gave important information of efficacy of spice phenol antioxidants. Curcumin is one of the famous spice phenols, which has been widely used in food as a yellow pigment. Curcumin was originally isolated from turmeric and, recently, other curcuminoids were also found in turmeric-related Zingiberaceae plants. These curcuminoids are powerful food antioxidants which are also expected as effective human disease preventive materials. This report deals with analytical results of radicalic curcumin conversion obtained by means of HPLC and chemical structure analyses.

Radicalic reaction products of curcumin with AIBN was analyzed by HPLC. Many peaks were observed. However, the products could be divided into two types. One was non yellow type which was observed in r.t. 6~9 min and was accumulated continuously, and another was yellow type which was observed in r.t. at 25~29 min. These compounds were purified and the chemical structures were elucidated. Non yellow compounds are ferulic acid, vanillin, and diketone, which would be produced by radicalic fragmentation reaction. Five compounds were also isolated from yellow mixture and these chemical structures were very similar to each other. A main compound G was intensively analyzed and was revealed that G is curcumin-curcumin dimeric compounds. Structural information of both type compounds indicated that radical reaction of curcumin was terminated at trans olefinic position of curcumin.

Radical reaction of curcumin was also analyzed in the presence of lipid, one of important food constituents. HPLC analytical data of the reaction using methyl linoleate was significantly different. A new peak was observed at r.t. 14 min. Isolation of the peak compound gave small amount of compound I-1 and I-2. The chemical structures of I-1 and I-2 was investigated. NMR data indicated that both I-1 and I-2 were cross coupling

products with curcumin and lipid. MS of I-1 and I-2 gave molecular ion peak at m/z 692, indicating that I was constituted of curcumin, methyl linoleate and oxygen. Further structural elucidation is now in progress.

This research project clarified that curcumin was converted to fragment or dimeric compounds during the antioxidant reaction and in the presence of lipid, curcumin was converted to cross coupling products with lipid.