

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
(食品安全確保研究事業)
既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究
協力研究報告

天然増粘安定剤アロエベラ抽出物の低分子量成分の分析

協力研究者 八代崇寛 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨 天然増粘安定剤アロエベラ抽出物製品の低分子量成分について TLC 及び LC/MS を用いて検討した。その結果、アロエベラ抽出物製品より、アロエベラ抽出物に特徴的な低分子量成分は検出されなかった。

A. 研究目的

天然増粘安定剤アロエベラ抽出物は、既存添加物名簿収載品目リストに、その基原・製法・本質として、「ユリ科アロエ(*Aloe vera* LINNE)の葉より、搾汁して得られたものである。主成分は多糖類である。」と記載されている。学名アロエベラ(*A. vera* = *A. barbadensis*)の植物名はキュラソーアロエであり、もっぱら医薬品に属することから薬事関連通知(医薬局長通知, 医薬発第 1115003 号, 平成 14 年 11 月 15 日)に記載の通り、葉皮を除いた葉肉部のみが食品として扱われる。このことから、天然食品添加物である本抽出物も葉肉部のみから調製されるか、アロエの薬用成分とされるアロイン(aloin)(アロエの抽出エキスから Ca 塩を経て得られる化合物の混合物)を完全に除かれたものであると考えられる。一方、局方に収載され、医薬品として用いられるアロエは、基原植物 *Aloe ferox* Miller 又はこれと *Aloe africana* Miller 又は *Aloe spicata* Baker との雑種(Liliaceae)の葉から得た液汁を乾燥したものであり、日本市場ではケープアロエ(Cape Aloe)のみが取り引きされている。即ち、局方アロエは、天然添加物アロエベラ抽出物とは全く別のものである。そこで、アロエベラ抽出物中の aloin の有無、局方アロエおよび

aloin の低分子量成分の組成について、LC/MS により比較検討した。また同時に、アロエベラ抽出物の TLC による確認試験法について検討した。

B. 研究方法

1) 試料

アロエベラ抽出物(*Aloe vera extract*)製品およびは、日本食品添加物協会を通じて入手した。局方アロエ(アロエ末)は、鈴粉末薬品(株)より購入したものを用いた。アロイン(aloin)は、和光純薬工業(株)、ナカライテスク(株)、Sigma 社より購入したものを用いた。バルバロイン(*barbaloin*)は、Sigma 社より購入したものを用いた。β-シトステロール(*β-sitosterol*)は、タマ生化学工業(株)より購入したものを用いた。アロエベラ(*A. vera* = *A. barbadensis*)は、国立医薬品食品衛生研究所薬用植物栽培試験場(筑波)より分与していただいたものを用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2) 装置

各種機器データは、次の機器を用いた。

液体クロマトグラフ/質量分析装置(LC/MS):
Waters LC/MS system (Waters 社製) (Alliance 2965 with 2996 photodiode array detector and ZQ4000)。

オープンカラムクロマトグラフィー:担体とし

て Silica gel 60N (球状, 中性, 関東化学(株))を用いた。

薄層クロマトグラフィー(TLC) : 順相 : Silica gel 60 F254 Art. 1.05715 (20 x 20 cm, Merck), 逆相 : HPTLC-RP-18 WF_{254s} plates (10 x 10 cm, No. 1.13124, Merck 社製)

3) LC/MS 条件

LC conditions: column, Waters Atlantis dC₁₈ (2.1 x 150 mm, 3 μm); column temp., 40°C; solvent, H₂O : MeOH 0 min = 75 : 25 → 30 min = 60 : 40 → 45 min = 0 : 100; rate, 0.2 mL/min; inject., 1.0 μL; detect., PDA 191-600 nm, 293 nm.

MS conditions: source temperature, 120°C; desolvation temperature, 350°C; desolvation gas, 350 L/h; cone gas, 60 L/h, capillary, 3.0 kV; cone, 30 V (ESI pos.), -30 V (ESI neg.); scan range, *m/z* 100-1000.

4) LC/MS 分析用試料溶液の調製

アロエベラ抽出物製品 300 mg を精密に量りとり, 50 mL の共栓遠心沈澱管に入れ, MeOH 50 mL を正確に加え, 30 分間振とう抽出した後遠心分離(3000 rpm, 10 min)し, 上澄液を試料溶液(AVP)とした。別に同様な操作で局方アロエより試料溶液(JP)を作成した。

Aloin (各社製試薬) 5.0 mg を精密に量りとり, MeOH 1.0 mL に溶解し, 0.45 μm フィルター (Millipore, Millex-LH)を通した後, ろ液を試料溶液(AL)とした。

アロエベラの葉(葉皮を含む) 2.0 g を量りとり, MeOH 20 mL を加え, 室温下, 2 時間抽出した。抽出液を綿栓ろ過し, アロエベラ抽出エキス(AV ext.)とした。

5) アロエベラ抽出物中の SPG および SG の確認

アロエベラ抽出物中の β-sitosterol-3-O-6-plmitoyl-β-D-glucopyranoside (SPG) および β-sitosterol-3-O-b-D-glucopyranoside (SG)の確認をアロエベラ食品規格基準(健康補助食品規格基準集(追補), 日本健康・栄養食品協会, 平成 13 年 11 月 1 日)に記載の方法に準じて行っ

た。

アロエベラ抽出物製品 20 g を共栓フラスコに採取し, CH₂Cl₂ 100 mL を加え, 室温で 24 時間攪拌抽出した。ろ過後得られた抽出液を減圧乾固し, 残渣を少量の hexane-acetone (20:1)混液に溶解し, silica gel (30 g)を担体とするカラムクロマトに付し, hexane-acetone (20:1)混液 300 mL を流した後, 順次,(10:1)混液, (5:1)混液および acetone 各 300 mL を用いて溶出させ分別採取し, 20:1 混液抽出部(PA), 10:1 混液抽出部(PB), 5:1 混液抽出部(PC)を得た。採取した各溶出部を減圧下, 0.5 mL まで濃縮して TLC 用試験溶液とし, 各 12.5 μL を TLC に付した。

アロエベラの葉皮を除去して得た葉肉 28.5 g を凍結乾燥し, 0.435 g 白色固形物を得, 粉碎後, CHCl₃ 100 mL を加え, 室温下, 時々振り混ぜながら 48 時間抽出した。この CHCl₃ 抽出物を減圧下, 濃縮乾固し, 得られた 5.8 mg の残渣を少量の hexane-acetone (20:1)混液に溶解し, silica gel (30 g)を担体とするカラムクロマトに付し, hexane-acetone (20:1)混液 300 mL を流した後, 順次, (10:1)混液, (5:1)混液および acetone 各 300 mL を用いて溶出させ分別採取し, 20:1 混液抽出部(MA), 10:1 混液抽出部(MB), 5:1 混液抽出部(MC)を得た。採取した各溶出部を減圧下, 0.5 mL まで濃縮して TLC 用試験溶液とし, 各 5.0 μL を TLC に付した。

アロエベラの葉皮を除去して得た葉肉 30.1 g を凍結乾燥し, 0.435 g の白色固形物を得, 粉碎後, MeOH 100 mL を加え, 室温下, 時々振り混ぜながら 48 時間抽出した。この MeOH 抽出物(MM)を減圧下, 濃縮乾固した。2 mL の CHCl₃-MeOH (1:1)混液に溶解し, TLC 試料溶液とし, 5.0 μL を TLC に付した。

TLC は上記の各試料を上記の容量ずつ付し, 同時に比較としてβ-sitosterol (2.0 mg/mL)を付し, CHCl₃-MeOH (9:1) を展開溶媒として約 10 cm の高さまで展開した。展開後, 10% H₂SO₄/MeOH を

噴霧-加熱してスポットを観察した。

C. 結果及び考察

1. LC/MS 分析

アロエベラ抽出物製品の aloin の有無を確認するために、LC/MS 分析を行った。Fig. 1 にアロエベラ抽出物製品(AVP), 局方アロエ(JP), 試薬 aloin (AL)および *Aloe vera* の葉(葉皮を含む)より調製した抽出エキス(AV ext.)のクロマトグラム(検出波長: UV 293 nm)を示した。なお、各社製試薬 aloin は、すべて *Aloe vera* を基原植物として調製されたものであり、ほぼ等しいクロマトグラムを示したので代表的なものだけを示した。ピーク 1 は、ESI-MS (neg. and pos.)において、 m/z 393 [M-H], 395 [M+H]⁺を与え、aloesin (MW394)と決定した。ピーク 4 は、barbaloin 標品との比較により、ピーク 4 が barbaloin であることを確認した。また、ピーク 3 は、ピーク 4 と完全に等しい PDA 及び MS スペクトルを与えたことから、barbaloin の 10 位のエピマーの isobarbaloin と決定した。*Aloe vera* の葉(葉皮を含む)より調製した抽出エキス(AV ext.)は、試薬 aloin (AL)と完全に等しいパターンを示した。(Fig. 1b, 1c) 一方、局方アロエ(JP)のクロマトグラムは AV ext.および AL とは若干異なり、ピーク 1, 3, 4 以外にピーク 2 が大きく観察された。ピーク 2 は、ESI-MS (neg. and pos.)において、 m/z 539 [M-H], 541 [M+H]⁺を与え、aloesin A または aloeresin E のいずれかと推定されたが、PDA スペクトルが aloeresin A の文献値と完全に一致することから、ピーク 2 を aloeresin A と決定した。したがって、JP の低分子量成分の組成は、*Aloe vera* を基原とするものと若干異なることがわかった。

次に、アロエベラ抽出物製品(AVP)中の低分子量成分を同様な条件で観察したところ、全くピーク(1, 2, 3, 4)は観察されなかった。したがって、AVP は、薬用成分である aloin を完全に除いたものか、あるいは葉肉部より調製したのと考えら

れ、食品添加物として妥当であるものと考えられた。

2. TLC 分析

健康補助食品規格基準集に記載の方法によれば、アロエベラ食品の製品規格として、アロエ属特有の成分である β -sitosterol-3-O-6-plmitoyl- β -D-glucopyranoside (SPG) および β -sitosterol-3-O-b-D-glucopyranoside (SG)が検出されることが規定されている。そこで、「SPG 及び SG の確認試験法」を参考に、既存添加物アロエベラ抽出物に SPG および SG が TLC 上で検出されるかどうか検討した。

まず、アロエベラ抽出物製品を本試験法に準じて抽出し、得られた試験溶液に SPG および SG が検出されるかどうか検討した。なお、アロエベラ抽出物製品は、製品化に際し賦形剤を添加していることを考慮して、本製品 20 g (本来の確認試験では 5 g)を用いて各抽出部(PA, PB, PC)を得、さらに濃縮率も 10 倍以上としてそれぞれ調製したものを TLC に付した。本確認試験の記載によれば、SPG および SG は、それぞれ展開溶媒との移動比が 0.4 ± 0.1 および 0.15 ± 0.05 となるような位置に斑点として検出されるはずである。しかし、それらに該当するような斑点は見出せず、 β -sitosterol に由来するスポットとその付近にのみスポットが観察された。(Table 1)

次に、アロエベラの葉肉を用いて、同様にして抽出部(MA, MB, MC)を調製し、実際に SPG および SG が確認されるかどうか検討したところ、すべての抽出部より SPG および SG に相当するスポットは検出されなかった。したがって、基原植物から調製したにも関わらず、SPG および SG が検出できなかったことから、本確認試験法は、SPG および SG を検出するには不適當である可能性が示唆された。

そこで、本試験法では、CHCl₃ を SPG および SG の抽出溶媒として用いているが、CHCl₃ では

SPGおよびSGの様な配糖体が抽出されにくいと予想されることから、アロエベラの葉肉をMeOHで抽出したMeOH抽出物(MM)についてTLCで確認を行った。その結果、MeOH抽出物(MM)には、多くのスポットが確認され、その内、 $R_f = 0.50, 0.41, 0.17$ のスポットがSPGおよびSGに相当するものと考えられたが、スポットの強度は非常に小さかった。よって、アロエベラ抽出物中のSPGおよびSGの確認試験法については、抽出溶媒や濃縮方法などを今後詳細に検討した後に再確認する必要があると考えられた。

D. 結論

天然増粘安定剤アロエベラ抽出物製品の低分子量成分についてLC/MSおよびTLCを用いて検討した結果、以下のことがわかった。

1. 既存添加物名簿収載品目リストにアロエベラ抽出物は、その名称として「アロエベラ抽出物（アロエの葉から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）」、また、基原・製法・本質と

して「ユリ科アロエ(*Aloe vera* LINNE)の葉より、搾汁して得られたものである。主成分は多糖類である。」と記載されている。しかし、調査の結果、葉皮には医薬品成分であるアロインが含まれることから、その記載をそれぞれ「・・・葉から得られた・・・」から「・・・葉肉から得られた・・・」、 「・・・葉より、搾汁して・・・」から「・・・葉肉より、搾汁して・・・」に変更するか、「アロインを除いたもの」の一文を追加する必要があると思われた。

2. アロエベラ抽出物製品中にアロインが存在するかどうかLC/MSを用いて検討した結果、本抽出物中には含まれないことがわかった。

3. 本製品がアロエベラ抽出物であることを確認するために、健康補助食品規格基準に従い、アロエ属特有成分である β -sitosterol-3-O-6-palmitoyl- β -D-glucopyranoside (SPG)及び β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (SG)の検出を試みたが、アロエベラ抽出物製品から検出されなかった。

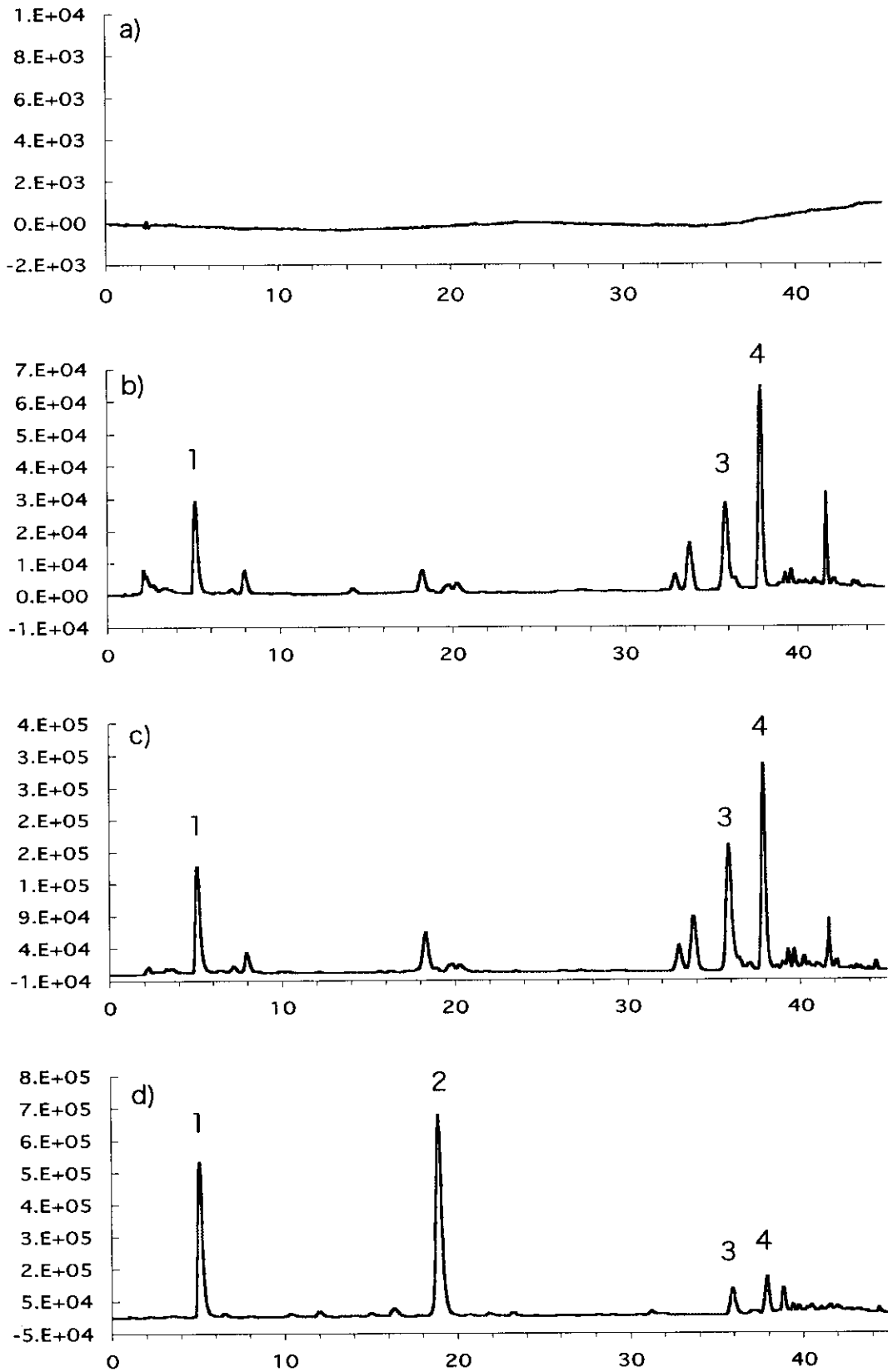


Fig. 1 LCチャート

a) アロエベラ抽出物製品. b) アロエベラの葉を抽出したもの. c) アロイン(試薬).
 d) 局方アロエ. 1 = aloesin (m/z 393 [M-H]⁻, 395 [M+H]⁺). 2 = aloeresin A (m/z 539 [M-H]⁻, 541 [M+H]⁺). 3 = isobarbaloin (m/z 417 [M-H]⁻, 419 [M+H]⁺). 4 = barbaloin (m/z 417 [M-H]⁻, 419 [M+H]⁺).

Table 1 アロエベラ抽出物中のSPGおよびSGのTLCによる確認

	Rf 値
β -sitosterol	0.7
アロエベラ抽出物製品	
20:1混液抽出部 (PA)	0.85, <u>0.70</u>
10:1混液抽出部 (PB)	0.85, <u>0.70</u> , 0.62
5:1混液抽出部 (PC)	0.85, 0.58
アロエベラ葉肉抽出物	
20:1混液抽出部 (MA)	0.85, <u>0.70</u>
10:1混液抽出部 (MB)	0.62
5:1混液抽出部 (MC)	-
MeOH抽出物 (MM)	0.84, 0.73, <u>0.67</u> , 0.61, 0.50, 0.41, 0.17, 0.06, 0.00

下線は β -sitosterolを示す。

別添

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

協力研究報告書

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

天然苦味料ニガヨモギ抽出物の主成分に関する研究

協力研究者 八代 崇寛 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部研究員

協力研究者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨；天然苦味料ニガヨモギ抽出物の主成分およびその他のセスキテルペン二量体の構造について検討した結果，アブシンチン(absinthin (1))およびアナブシンチン(anabsinthin (2))を同定した．また，主成分の 1 を定量した結果，本抽出物製品中に 2.0%含有されることを明らかとした．

A. 研究目的

天然苦味料ニガヨモギ抽出物は，既存添加物収載品目リストにその基原・製法・本質として，「キク科ニガヨモギ(*Artemisia absinthium* L.)の全草より，水又は室温時エタノールで抽出したものである．主成分はセスキテルペン(アブシンチン(absinthin)等)と記載されている．ニガヨモギ (*A. absinthium*) はヨーロッパからシベリアにかけて分布し，ワームウッドとして知られるキク科の多年生草本で，駆虫作用，抗マラリア作用，健胃作用および強壮作用などを示す．ニガヨモギの水やエタノールによる抽出物はその強い苦味と芳香のためアブシントエキス（日本名：ニガヨモギ抽出物）とよばれ，酒類などの飲料の天然苦味料として用いられる．

しかし，既存添加物としてのニガヨモギ抽出物製品の成分組成を分析した例はない．

そこで，前年度は，過多の摂取で嘔吐，下痢，意識混濁の原因成分とされる精油成分の一つ α -， β -thujone の有無について検討した．今年度は，さらに，ニガヨモギ抽出物製品およびその基原植物に含有される化学成分の単離および構造決定を行い，ニガヨモギ抽出物の主成分アブシンチンおよびセスキテルペン二量体の分析法および確認法を確立することを目的とした．

B. 研究方法

1. 試料および試薬

ニガヨモギ抽出物製品(液体)は，日本添加物協会を通じて入手したものをを用いた．ニガヨモギの乾燥植物(地上部)はハーブティ専門店イーティザーヌ(ウェブサイト www.rakuten.co.jp/e-tisanes/)より購入した．試薬および有機溶媒は研究用のものを精製せずに用いた．TLCには Silica gel 60 F254

(20 cm x 20 cm, Art. 1.05715 (Merck Co., Ltd.)) and RP-18WF254s (10 cm x 10 cm, Art.13124 (Merck))を用いた。PTLC には、Silica gel 60 F254 (20 cm x 20 cm, 0.5 mm, Art. 1.05744 (Merck Co., Ltd.))を用いた。オープンカラムクロマトグラフィには Silica gel 60 (70-230 mesh Art. 1.07734 (Merck)) and ODS (200-350 mesh, Chromatorex ODS (Fuji Silica Chemical Ltd.))を用いた。

2. 装置

各種機器データは、次の機器を用いた。

LC/MS: Waters LC/MS system (Waters 社製) (Alliance 2965 with ZQ4000 or micro™)

FAB-MS: JEOL JMS-700 (日本電子(株)製)。

NMR: JEOL ECA-600 or ECA-800 (日本電子(株)製)。NMR のケミカルシフト値は、¹H においては TMS (tetramethylsilane)シグナルを内標準とし、¹³C では溶媒シグナルを標準として測定した。炭素および水素の各シグナルは HMQC および HMBC により帰属した。

3. LC/MS 条件

Analytical LC conditions: column, Waters Atlantis™ dC₁₈ (2.1 mm x 150 mm, 3 μm); column temp., 40°C.; solvent, MeOH:H₂O = 50:50 (0 min)→90:10 (30 min); inject, 10 μL; rate, 0.2 mL/min; splitter, PDA: 191-600 nm; detect, 210 nm.

MS conditions: source temperature, 120°C; desolvation temperature, 350°C; desolvation gas, 350 L/h; cone gas, 60 L/h, capillary, 3.0 kV; cone, 50 V (ESI pos.); scan range, *m/z* 100-1000.

4. 化合物 1 および 2 の単離・精製

ニガヨモギ抽出物製品 20 mL に H₂O 90 mL と CHCl₃ 90 mL を加え、よく振とうし、遠心分離した後、CHCl₃ 層を分取した。残った H₂O 層はさらに 2 回 CHCl₃ で同様に抽出した。得られた CHCl₃ 層をあわせ、減圧濃縮し、1.29 g の CHCl₃ 抽出物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、CHCl₃-acetone 混液(19 : 1, 8 : 2, 5 : 5 の各 200 mL および acetone 100 mL) および CHCl₃-MeOH 混液(5 : 5, 0 : 10 の各 100 mL)を用いて、TLC で確認しつつ分画し、減圧濃縮して、計 11 のフラクション(Fr. 1-11)を得た。次に Fr. 5 の半量を ODS カラムクロマトグラフィに付し、H₂O-MeOH 混液(2 : 3)を溶離液とし、TLC で確認しつつ分画を行い、粗精製の化合物 1 (36 mg) および 2 (23 mg)を得た。さらに粗化合物 1 を分取 TLC (silica gel, toluene-CHCl₃-AcOEt (3 : 5 : 12), 検出波長: UV 254 nm) により精製し化合物 1 を 15 mg 得た。また、粗化合物 2 は再結晶により精製し、化合物 2 を 5 mg 得た。

5. 分析用試験溶液の調製

ニガヨモギ抽出物製品(液体)10 μL に 50% EtOH 990 μL を加え、100 倍希釈したものを分析用試験溶液とした。

細切りした *A. absinthium* 乾燥植物 5.0 g を H₂O-EtOH (1 : 1)混液 100 mL で室温下、3 日間抽出した。ろ過後、ろ液 10 mL を減圧乾固し、50% EtOH を加え、5 倍濃縮液を調製し、分析用試験溶液とし、ニガヨモギ抽出物製品との比較に用いた。

6. TLC 分析

TLC には RP-18WF254s (蛍光剤入り) を用いた。TLC 展開後 254 nm の UV を照射し UV 吸収を有するスポットを観察した。その後 10% H₂SO₄ in MeOH を噴霧し、ホットプレート (160°C) 上で加熱発色させた。

7. 1 の定量

単離・精製した **1** 1.0 mg を MeOH 2.0 mL に溶解し、1/2 希釈を繰り返し、0.125 mg/mL から 0.5 mg/mL の検量線作成用溶液を調製した。

C. 結果および考察

1. 主成分およびその他のセスキテルペン二量体の構造決定

化合物 **1** は FAB-MS (pos.) において、*m/z* 519 [M+Na]⁺, 497 [M+H]⁺, 479 [M-H₂O+H]⁺ および *m/z* 249 に逆 Deels-Alder 反応生成物に由来するピークを認めた。¹H-NMR スペクトルの各シグナルは ¹H-¹H COSY により帰属し、¹H および ¹³C のスペクトルデータを文献値 (Tetrahedron Letters, 21, 3191-3194 (1980)) と比較することにより、化合物 **1** をニガヨモギ抽出物の主成分とされる absinthin (**1**) と同定した。(Fig. 1, Table 1)

化合物 **2** は、FAB-MS (pos.) により *m/z* 497 [M+H]⁺ を認め、¹³C-NMR において 2 つのカルボキシル基に由来するシグナル (δ 178.85, 179.37) と一組のオレフィンに由来するシグナル (δ 135.33, 143.45) を確認した。¹H および ¹³C の NMR スペクトルの比較から、**1** とほぼ同様の基本骨格を持つものと推定することができ、さらに ¹H-¹H COSY,

HMQC および HMBC により、化合物 **2** をニガヨモギの苦味成分の一つであるセスキテルペン二量体の absinthin (**2**) と同定した。(Fig. 1, Table 1) **2** は、**1** の骨格がシフトすることにより生じることが知られており、抽出過程や保存過程により生じたアーティファクトであると考えられている。

2. TLC および LC/MS 分析

ニガヨモギ抽出物製品の基原を確認するため、製品とその基原植物を 50% EtOH で抽出したものを TLC により比較した。

Fig. 2 に本抽出物製品、50% EtOH 抽出物、および単離・精製した **1** と **2** の TLC を示した。硫酸噴霧後の加熱により発色した本抽出物製品と 50% EtOH 抽出物は酷似しており、**1** と **2** に相当するスポットが確認できた。特に **1** に相当するスポットは強く発色した。

3. LC/MS 分析

Fig. 3 に本抽出物製品および 50% EtOH 抽出物のクロマトグラムを示した。両者を比較すると、50% EtOH 抽出物にのみに、保持時間 5 分以前に大きなピークが観察されたが、保持時間 13 分から 20 分に観察される両者のピークの数や形状は、ほぼ同様であった。保持時間 14 分に観察されたピークは、ESI-MS (pos.) において、*m/z* 519 [M+Na]⁺ を与え、また、単離・精製した **1** との比較により、このピークが **1** によるものと確認した。同様に、保持時間 17.5 分に観察される小さなピークは、ESI-MS (pos.) において、*m/z* 519 [M+Na]⁺, 497 [M+H]⁺ を与え、また、単離・精製した **2** との比較により、このピ

ークが 2 によるものと確認した。このピークが小さく観察されたのは、化学構造中に 1 に比べ 2 は二重結合が一つ少ないため、検出波長 210 nm における吸収も少ないためであると考えられた。なお、他に観察されたピークは複雑な混合物であり化合物の同定には至らなかった。

以上の結果から、ニガヨモギ抽出物製品はニガヨモギ *A. absinthium* を基原とするものであると確認できた。

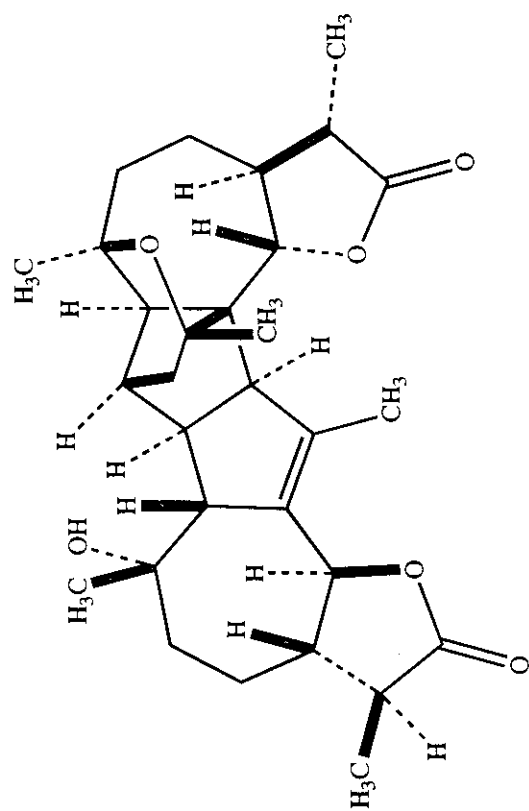
さらに、ニガヨモギ抽出物製品中の 1 の定量を検出波長 210 nm において行った結果、本抽出物製品中に 1 が 2.0% ($y = (247019)x + (-57.5645)$, 相関係数 $r^2 = 0.999$) 含まれることを明らかとした。

D. 結論

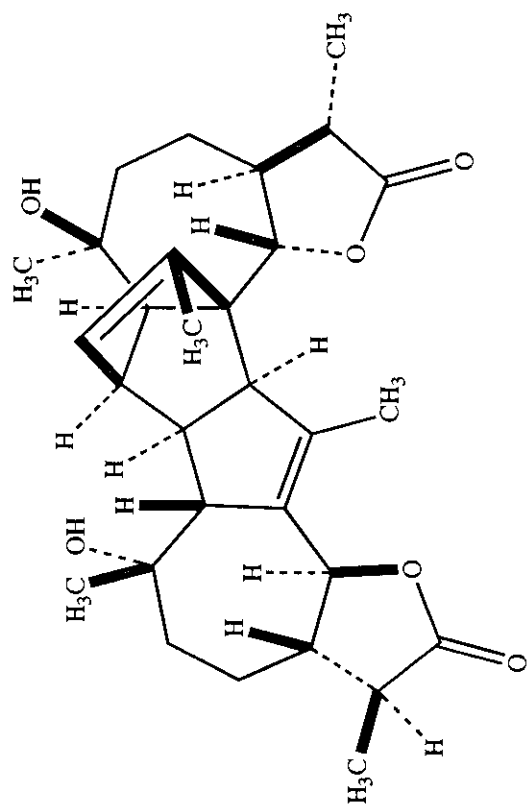
天然苦味料ニガヨモギ抽出物の主成分およびその他のセスキテルペン二量体について単離・構造決定した結果、absinthin および anabsinthin を同定した。また、ニガヨモギ抽出物製品とその基原植物とされるニガヨモギ (*A. absinthium*) の地上部より抽出したエキスを TLC および LC/MS により比較した結果、本抽出物製品が、既存添加物収載品目リストの記載の通り、ニガヨモギ (*Artemisia absinthium*) を基原としていることが確認された。

Table 1 NMR (δ , CDCl₃) signal assignment of absinthin (1) and anabsinthin (2)

position	Absinthin (1)		Anabsinthin (2)	
	carbon	proton	carbon	proton
1	71.50	1.96	62.99	2.35s
2	45.75	2.83	41.26	2.19t
3	122.16	5.54	34.69	1.48m, 1.67m
4	147.72	-	88.35	-
5	64.25	-	62.13	-
6	82.73	4.71	82.33	4.14d
7	46.60	1.81	49.20	1.77m
8	27.59	1.86	25.61	1.52m, 1.76m
9	43.81	1.88	39.21	1.45m, 1.79m
10	74.21	-	77.85	-
11	42.39	2.23	43.88	1.57mt, 1.87m
12	178.50	-	179.08	-
13	13.19	1.23	12.10	1.21d (3H)
14	29.44	1.17	27.08	1.26s (3H)
15	13.81	1.76	16.99	1.19s (3H)
1'	57.16	2.26	56.69	2.53s
2'	46.82	2.79	43.20	2.70d
3'	58.93	3.18	52.49	3.47s
4'	134.94	-	132.35	-
5'	148.44	-	148.43	-
6'	81.43	4.57	81.02	4.66d
7'	49.45	1.69	49.45	1.85m
8'	23.68	1.47	23.57	1.79m, 1.53m
9'	42.56	1.65	42.50	2.23m (2H)
10'	72.02	-	74.36	-
11'	42.14	2.18	42.71	2.24m
12'	178.88	-	178.58	-
13'	12.29	1.19	12.38	1.22d (3H)
14'	32.37	1.29	29.43	1.27s (3H)
15'	18.41	1.92	16.66	1.94s (3H)



Anabsinthin (2)



Absinthin (1)

Fig.1 Structures of absinthin (1) and anabsinthin (2)

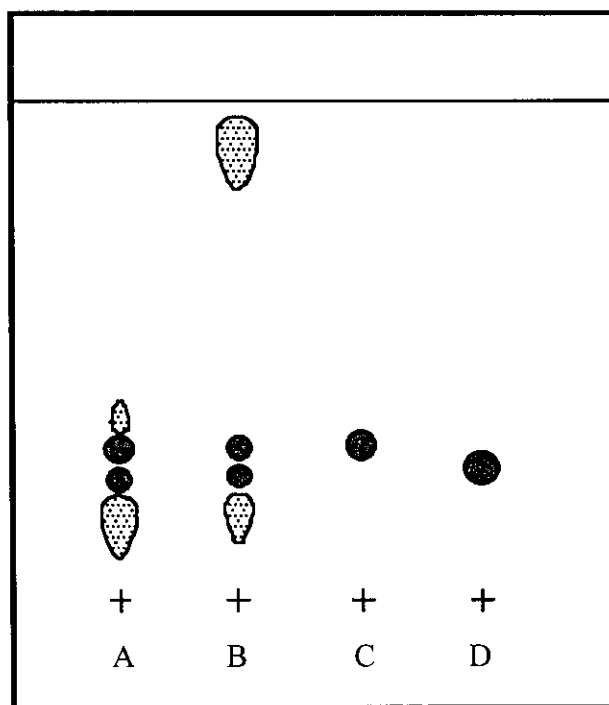


Fig. 2 ODS-TLC profiles of absinth extract product and 50% ethanol extract of aerial part of *A. absinthium*.

A) absinth extract product. B) 50% EtOH extract (prepared from aerial part of *A. absinthium*). C) absinthin (1). D) anabsinthin (2). Solvent: MeOH : water = 3 : 2. Spots visualized with $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$.

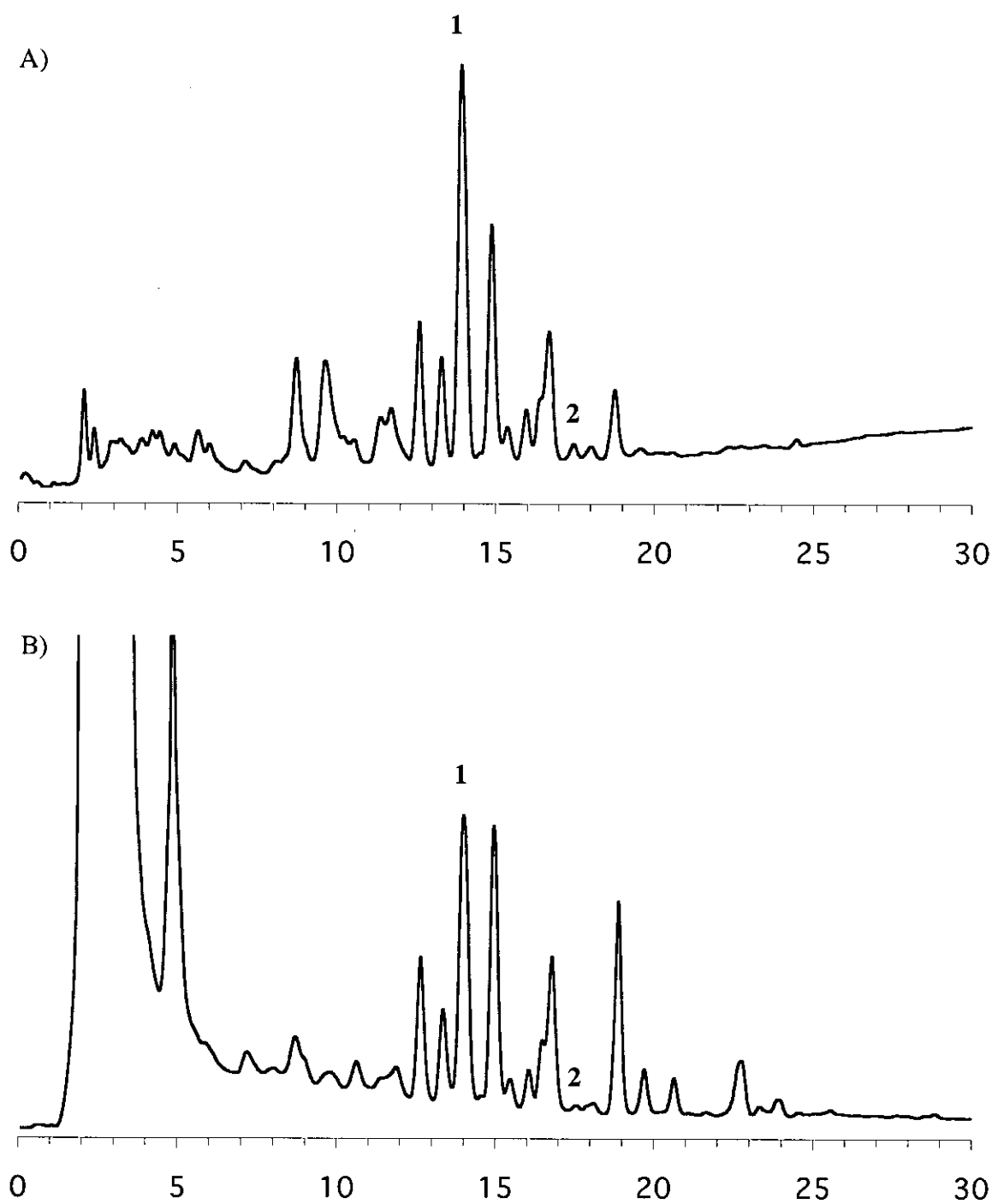


Fig. 3 LC profiles of absinth extract product and 50% ethanol extract of aerial part of *A. absinthium*. A) absinth extract product. B) 50% EtOH extract (prepared from aerial part of *A. absinthium*). absinthin (1). anabsinthin (2).

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

既存添加物「アルカネット色素」の成分に関する研究

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究要旨 「アルカネット色素」規格作成に関する基礎的研究を行い、同色素中の主色素成分がヒドロキシナフトキノンのエステル化体であり、それら化合物の立体が **alkannin** 型 (*S*-configuration)ではなく **shikonin** 型 (*R*-configuration)であることを明らかにした。

協力研究者

酒井信夫(国立医薬品食品衛生研究所 生薬部, 現
千葉大学大学院薬学研究院)

A. 研究目的

アルカネット色素は、既存添加物名簿収載品目リストに、「ムラサキ科アルカネット(*Anchusa officinalis* L.)の根より、エタノールで抽出して得られたものである。主色素はアルカニンである。赤～赤紫色を呈する。」と記載されている。基原植物のムラサキ科アネクサ属オツフィキナリスは、ヨーロッパ原産の二年草または多年草で、着色料としての食品添加物の他、染料としても利用されている。ムラサキ科においてアルカネットと異連に分類される *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.の根は「硬紫根」と称される生薬であり、その主成分と考えられる **shikonin** (Fig. 1) や **acetylshikonin** は、漢方処方用薬の紫雲膏など、熱傷における皮膚疾患用外用処方に配合されている。また、同類生薬「軟紫根」の起源植物である軟紫草(*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.)やアルカンナ(*Alkanna tinctoria*)の根には **alkannin** (Fig. 1) が主成分として含まれることが報告されている。本研究では、平成14年度に90日間反復投与毒性試験の行われた既存添加物「アルカネット色素」の規格作成に関する基礎的検討を行うため、アルカネット色素を入手し、成分に関する研究を

行ったので報告する。

B. 研究方法

試料及び試薬 「アルカネット色素」(デキストリン添加)は日本食品添加物協会を通じて入手した。shikonin 標準品は和光純薬工業社製、長良サイエンス社製、CALBIOCHEM 社製、東京化成工業社製を購入した。メタノールはMERCK製のHPLC用を、水はRO水を更にMilli-Q(日本ミリポア製)により精製して得られた超純水を用いた。オープンカラムの担体は、日本錬水製DIAION HP-20(HP-20)を用いた。NMR 溶媒はクロロホルム-*d* 100% (Cambridge Isotope Laboratories 製)を用いた。その他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。本研究において、動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

装置及び測定条件 HPLCは島津製作所製 Shimadzu LC-10AT system(ポンプ: LC-10ATVP x 2, 紫外可視検出器: SPD10AVVP, カラムオープン: CTO-10ACVP)に、インテグレータとして Shimadzu C-R7A plus を接続したものを用い、下記条件で測定した。

[条件1] カラム: Inertsil ODS-3 (4.6 x 250 mm, GL Sciences 製), 移動相: リン酸緩衝液(0.2 M, pH 2.1) / メタノール (24 : 76), 流速: 0.8 mL/min, カラム温度 40°C.

[条件 2] カラム: Chiralcel-OJ (4.6 x 250 mm, ダイセル化学工業製), 移動相: *n*-ヘキサン / 2-プロパノール / 酢酸(95 : 5 : 0.3), 流速: 0.65 mL/min, カラム温度 40°C.

NMR は, JEOL ECA-600 及び ECA-500 を用いた.¹H-NMR 及び ¹³C-NMR の化学シフト値はテトラメチルシランに対する δ 値(ppm)で示した. Chemical Shift Correlation Spectroscopy (COSY), Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY), Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC)スペクトルの測定には, 磁場勾配システムを用いた.

MSはJEOL AccuTOFを用いた. 測定は試料を直接導入し, エレクトロスプレー(electrospray ionization: ESI)法によりイオン化を行い, positive ion mode で測定した. なお, 測定条件としてオリフィス電圧 75 V, リングレンズ電圧 10 V, 質量範囲 10~1000 *m/z*, スキャン時間 1.0 sec/spectrumとした. また, 精密試料は内部標準試料としてレセルピンを用いミリマス値を得た.

比旋光度の測定には, JASCO DIP-370 Digital Polarimeter を使用した.

化合物の単離 「アルカネット色素」粉末をメタノールで抽出し, 抽出液を HP-20 カラム (60 x 360 mm)に供した. 50%メタノールで洗浄後, 100%メタノール及びアセトンで溶出した画分を濃縮し, 分取 HPLC [カラム: Inertsil ODS-3 (20 x 250 mm, または 4.6 x 250 mm), 移動相: 74~80% メタノール(0.1% TFA), 流速: 9.5~12 mL/min, または 0.8~1.0 mL/min, カラム温度: 40°C] を用いて化合物 A~E を単離した.

C. 研究結果

化合物の同定 「アルカネット色素」メタノール抽出物を HPLC [条件 1]に供したところ, A~E の 5 本の主ピークが確認された(Fig. 2). 市販シコニンを標準品として用

いた各化合物の定量値は, A; 201 $\mu\text{g/g}$, B; 767 $\mu\text{g/g}$, C; 191 $\mu\text{g/g}$, D; 508 $\mu\text{g/g}$ 及び E; 706 $\mu\text{g/g}$ であった. 単離された化合物 A~E の全ての¹H-NMR スペクトルにおいて, ナフトキノ骨格に結合する 2 つの水酸基に由来する特徴的なシグナルが低磁場側に検出された. また, ESI-MS の測定結果より, A~E は, それぞれ, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ に対応する *m/z*, 311, 353, 381, 393, 395 の擬似分子イオンピークが観察された. 更に, 各種 2D-NMR スペクトルの詳細な検討を行ったところ, A の平面構造は 5, 8-dihydroxy-2-(1-hydroxy-4-methyl-3-pentenyl)-1,4-naphthalenedione であり, B は A の側鎖に結合した水酸基が acetyl 化された化合物, C は isobutyryl 化体, D は 3, 3-dimethylacryloyl 化体, E は isovaleryl 化体と同定した (Fig. 3).

化合物 A: Red amorphous powder, HR-TOFMS (ESI, positive mode), *m/z*: 311.0922 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. ¹H-NMR (CDCl_3): δ 1.59 (3H, s, H₃-6'), 1.69 (3H, s, H₃-5'), 2.30, 2.58 (each 1H, *m*, H₂-2'), 4.85 (1H, *m*, H-1'), 5.14 (1H, *t*, *J* = 6.9 Hz, H-3'), 7.10 (1H, *s*, H-3), 7.13 (1H, *s*, H-6), 7.13 (1H, *s*, H-7), 12.43 (*s*, OH-5), 12.54 (*s*, OH-8).

¹³C-NMR: see Table 1.

化合物 B: Red amorphous powder, HR-TOFMS (ESI, positive mode), *m/z*: 353.0987 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. ¹H-NMR (CDCl_3): δ 1.51 (3H, s, H₃-6'), 1.62 (3H, s, H₃-5'), 2.07 (3H, s, H₃-2''), 2.41, 2.55 (each 1H, *m*, H₂-2'), 5.05 (1H, *brs*, H-3'), 5.95 (1H, *brs*, H-1'), 6.92 (1H, *s*, H-3), 7.12 (1H, *s*, H-6), 7.12 (1H, *s*, H-7), 12.36 (*s*, OH-5), 12.52 (*s*, OH-8). ¹³C-NMR: see Table 1.

化合物 C: Red amorphous powder. HR-TOFMS (ESI, positive mode), *m/z*: 381.1302 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. ¹H-NMR (CDCl_3): δ 1.14 (3H, *d*, *J* = 6.9 Hz, H₃-4''), 1.18 (3H, *d*, *J* = 6.9 Hz, H₃-3''), 1.52 (3H, *s*, H₃-6'), 1.62 (3H, *s*, H₃-5'), 2.40, 2.57 (each 1H, *m*, H₂-2'), 2.57 (1H, *m*, H-2''), 5.04 (1H, *t*, *J* = 6.9 Hz, H-3'), 5.95 (1H, *dd*, *J* = 2.9, 10.9 Hz, H-1'), 6.90 (1H, *s*, H-3), 7.12 (1H, *s*,

H-6), 7.12 (1H, s, H-7), 12.36 (s, OH-5), 12.52 (s, OH-8). ¹³C-NMR: see Table 1.

化合物 D: Red amorphous powder. HR-TOFMS (ESI, positive mode), *m/z*: 393.1301 [M+Na]⁺. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.51 (3H, s, H₃-6'), 1.62 (3H, s, H₃-5'), 1.87 (3H, s, H₃-5''), 2.09 (3H, s, H₃-4''), 2.41, 2.55 (each 1H, *m*, H₂-2'), 5.08 (1H, *t*, *J* = 7.6 Hz, H-3'), 5.71 (1H, s, H-2''), 5.95 (1H, *m*, H-1'), 6.91 (1H, s, H-3), 7.12 (1H, s, H-6), 7.12 (1H, s, H-7), 12.37 (s, OH-5), 12.53 (s, OH-8). ¹³C-NMR: see Table 1.

化合物 E: Red amorphous powder. HR-TOFMS (ESI, positive mode), *m/z*: 395.1400 [M+Na]⁺. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.90 (3H, *d*, *J* = 5.5 Hz, H₃-4''), 0.91 (3H, *d*, *J* = 5.5 Hz, H₃-5''), 1.51 (3H, s, H₃-6'), 1.62 (3H, s, H₃-5'), 2.07 (1H, *m*, H-3''), 2.20 (2H, *m*, H₂-2''), 2.40, 2.54 (each 1H, *m*, H₂-2'), 5.06 (1H, *t*, *J* = 7.6 Hz, H-3'), 5.97 (1H, *m*, H-1'), 6.92 (1H, s, H-3), 7.12 (1H, s, H-6), 7.12 (1H, s, H-7), 12.36 (s, OH-5), 12.52 (s, OH-8). ¹³C-NMR: see Table 1.

光学異性体の確認 化合物 A の立体構造に関し、光学活性カラムを用いた HPLC [条件 2] で分析した。その結果、88% が shikonin (*R*-configuration) 12% が alkannin (*S*-configuration) であることが明らかとなった (Fig. 4)。また、市販 shikonin 標準品から単離された shikonin, 及び alkannin の比旋光度を測定したところ、前者の αD 値は +182.4, 後者は -247.6 を示した。更に、市販 shikonin 標準品 4 種について、HPLC を用いて shikonin / alkannin 存在比を分析したところ、shikonin 存在比の高い標準品 No. 1 及び No. 3 の αD 値は +541.7, +521.4 を示し、alkannin 存在比の高い標準品 No. 2 及び No. 4 の αD 値は -550.0, -364.6 を示した。単離された化合物 A~E の αD 値は、+9.1, +5.3, +22.9, +18.6, +20.9 と全て + を示した (Table 2)。次いで、化合物 B~E について、光学活性

カラムに供したが、どの化合物においても、ほぼ 1 本のブロードなピークとして観察され、本カラムでは、エステル体は光学分割出来ないことが判明した。

shikonin 及び alkannin の acetyl 化 市販 shikonin 標準品から単離された shikonin 及び alkannin を有機化学的に acetyl 化し、それらの比旋光度を測定した。反応の条件は種々検討し、無水酢酸, 4-ジメチルアミノピリジン (1 : 1) 溶液中, 60°C, 12 時間で高収率の acetyl 化体を得た。acetylshikonin 及び acetylalkannin の αD 値はそれぞれ +23.5, -6.7 を示し、反応前の化合物の偏光性が保持されることを確認した。従って、αD 値が全て正の値をもつ単離された化合物 B~E の立体は、全て shikonin 型の *R*-configuration のものが優位である可能性が高いものと推定された。

D. 考察

「アルカネット色素」は、既存添加物収載品目リストに、「ムラサキ科アルカネット (*Anchusa officinalis* L.) の根より、エタノールで抽出して得られたものである。主色素はアルカニンである。」と記載されている。本研究の結果、アルカネット色素製品に含まれる主化合物はナフトキノンの数種エステル誘導体 (acetyl 化体, isobutyryl 化体, 3, 3-dimethylacryloyl 化体, isovaleryl 化体) であることが明らかとなった。従って、上記の研究結果をふまえ、「アルカネット色素」に含まれる主色素成分は alkannin ではなくエステル型 shikonin / alkannin であると記述すべきものと考えられる。

自然界において光学異性体を有する化合物は一方の異性体のみが生理活性あるいは薬理作用を示す場合が多く、不斉合成や光学分割が医薬品研究において重要な課題となっている。本研究では、光学活性カラムを用いた HPLC 分析及び比旋光度測定による結果から、「アルカネット色素」には、shikonin 型 (*R*-configuration) の化合物が多く含まれることが明らか

となった。

天然物由来と考えられる数種市販 shikonin 色素に含まれる shikonin / alkannin 存在比が二極化されていること、また、shikonin / alkannin の acetyl 化において反応前の偏光性が保持されることから、アルカネット色素中に多く含まれる shikonin 及びそのエステル誘導体は、alkannin が異性化されたものではなく、植物に含まれている成分の立体がそのまま反映されているものと推定される。我々が文献検索を行ったかぎりでは、アルカネット色素の基原植物である、ムラサキ科アルカネット(*Anchusa officinalis* L.) の主色素成分の立体が、alkannin 型であると報告された例はない。従って、どのような由来で、アルカネット色素の主色素成分が alkannin であると指定されたか不明であるが、もし、同植物の主色素成分が、alkannin 型であるすると、本色素の基原植物そのものが、*A. officinalis* ではない可能性が考えられる。従って、今後、同色素製品の基原植物に関して、DNA 分析等を用いて詳細に分析する必要が考えられる。

E. 結論

「アルカネット色素」に含まれる主色素成分は、5,8-dihydroxy-2-(1-hydroxy-4-methyl-3-pentenyl)-1,4-naphthalenedione を基本骨格とした数種エステル誘導体で、それら化合物の立体構造は、shikonin 型

(*R*-configuration)であることを明らかにした。

F. 健康危機情報

既存添加物名簿及びリストの記載の変更が必要と考えられるが、shikonin は、既に天然色素として長く人類が用いてきたものであり、直接健康危機に影響するものとは考えられない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

「既存添加物「アルカネット色素」の成分に関する研究」、酒井信夫、川原信夫、合田幸広、佐藤恭子、棚元憲一、日本食品衛生学会第 86 回学術講演会、(2003. 10. 岩手)。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

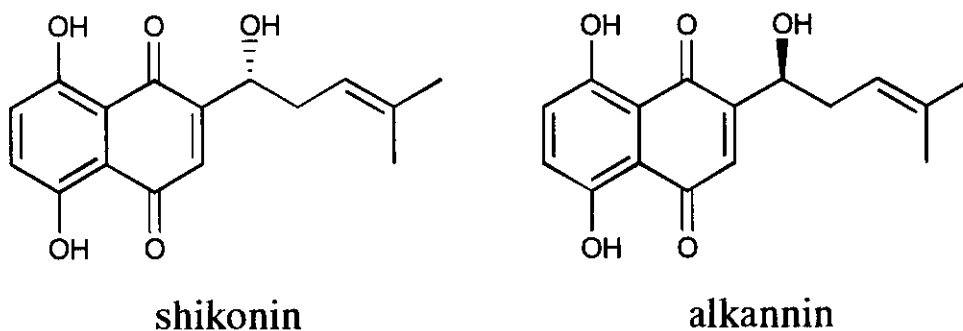


Fig. 1 Chemical structures of shikonin and alkannin

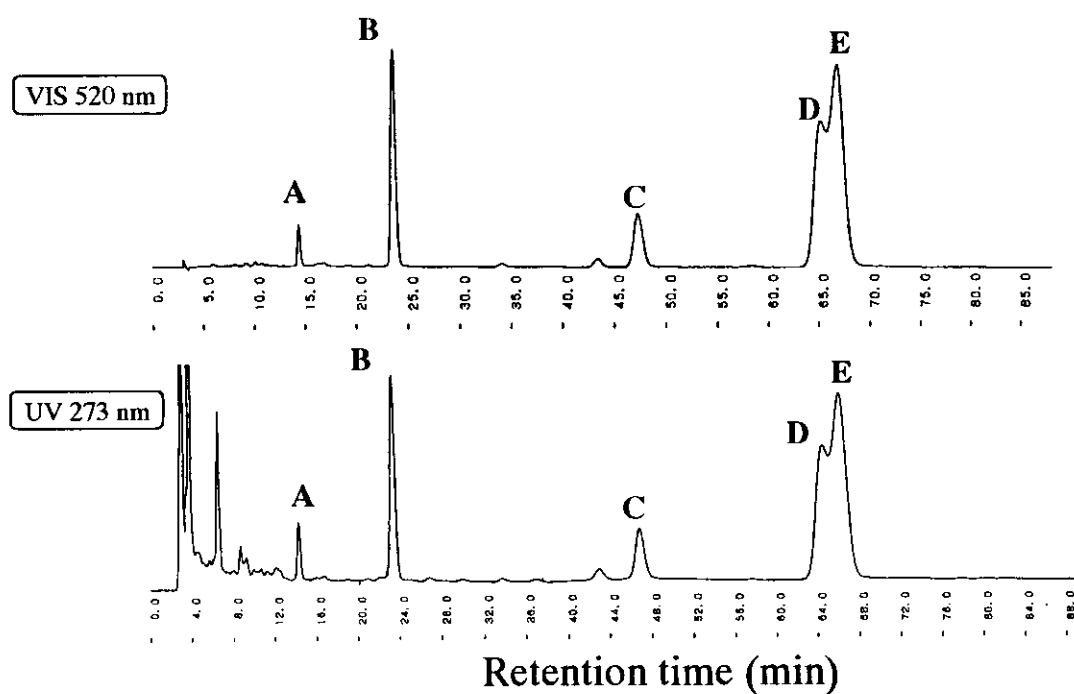


Fig. 2 Chromatograms of MeOH extract of alkanet colour
HPLC conditions; column: Inertsil ODS-3 (4.6 x 250 mm), flow rate:
0.8 mL/min, mobile phase: phosphate buffer (0.2 M, pH 2.1) / MeOH
= 24 / 76, temperature: 40 °C.

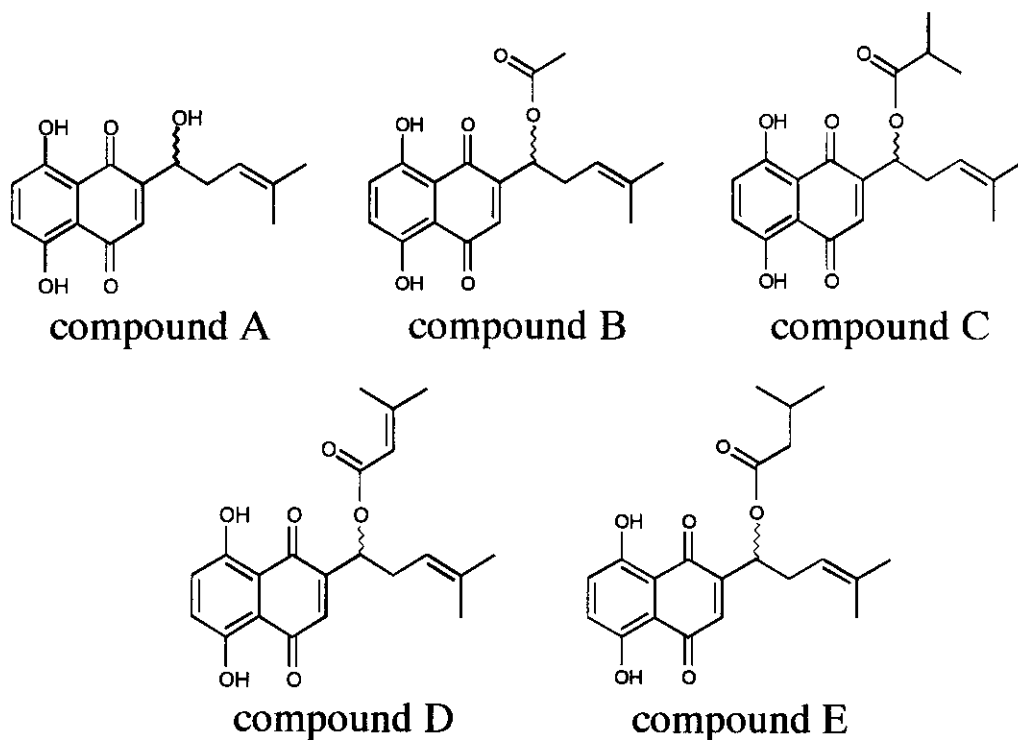


Fig. 3 Chemical structures of compounds extracted from alkanet colour

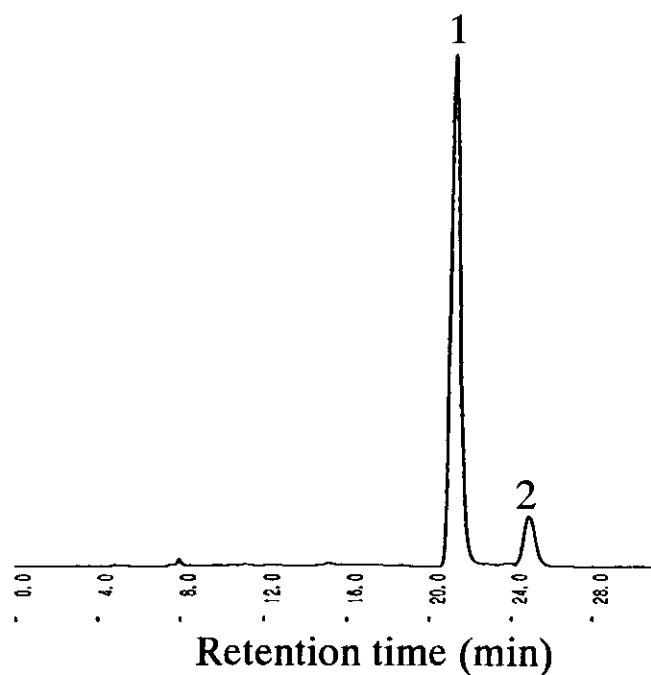


Fig. 4 Chromatogram of compound A on chiral phase column

HPLC conditions; column: Chiralcel-OJ (4.6 x 250 mm), mobile phase: *n*-hexane/2-propanol/HOAc=95/5/0.3, flow rate: 0.65 mL/min, temperature: 40 °C, detection: 273 nm.

Peak 1: shikonin, Peak 2: alkannin.