

Table 1. ^{13}C -NMR chemical shifts for shikonin/alkannin and its derivatives in CDCl_3

	shikonin †	A †	B †	C †	D *	E *
1	178.9	178.9	175.7	175.8	176.5	175.7
2	150.4	150.4	147.2	147.6	148.0	147.5
3	130.8	130.8	130.4	130.3	130.6	130.4
4	179.7	179.7	177.2	177.3	178.0	177.2
5	163.8	163.9	166.0	165.8	165.3	165.9
6	131.42 <i>a</i>	131.42 <i>b</i>	131.88 <i>c</i>	131.82 <i>d</i>	131.60 <i>e</i>	131.86 <i>f</i>
7	131.28 <i>a</i>	131.29 <i>b</i>	131.73 <i>c</i>	131.67 <i>d</i>	131.45 <i>e</i>	131.69 <i>f</i>
8	164.5	164.5	166.5	166.4	165.8	166.5
9	111.0	111.0	110.8	110.8	110.9	110.8
10	110.5	110.6	110.6	110.6	110.6	110.6
1'	67.4	67.4	68.5	68.0	67.6	68.2
2'	34.7	34.7	31.8	31.9	31.9	32.0
3'	117.4	117.4	116.7	116.8	117.0	116.9
4'	136.5	136.5	135.1	135.0	134.8	135.0
5'	25.0	25.0	24.7	24.7	24.7	24.7
6'	17.1	17.1	16.9	16.9	16.9	16.9
1''			168.8	174.8	164.3	170.9
2''			20.0	33.0	114.2	42.4
3''				17.83 <i>g</i>	158.0	24.7
4''				17.94 <i>g</i>	19.4	21.4
5''					26.6	21.4

* , Measured at 150 MHz (JEOL ECA-600). † , Measured at 125 MHz (JEOL ECA-500). Assignments were confirmed by HMQC and HMBC analyses. *a-g*, Assignments can be inverted. Chemical shifts were in good agreement with literature of Shen, C. [*J. Nat. Prod.*, 65, 1857 (2002)].

Table 2. Specific rotation and shikonin/alkannin ratio in commercially available standards

Samples	components (%)		Specific rotation (dissolved in MeOH)
	shikonin	alkannin	
commercial alkanet colour			
compound A	88.1	: 11.9	$[\alpha]_D^{25} = + 9.1$
compound B			$[\alpha]_D^{25} = + 5.3$
compound C			$[\alpha]_D^{25} = + 22.9$
compound D			$[\alpha]_D^{25} = + 18.6$
compound E			$[\alpha]_D^{25} = + 20.9$
shikonin standard No. 1	84.4	: 15.6	$[\alpha]_D^{25} = + 541.7$
shikonin [†]			$[\alpha]_D^{25} = + 182.4$
alkannin [†]			$[\alpha]_D^{25} = - 247.6$
shikonin standard No.2	13.1	: 86.9	$[\alpha]_D^{25} = - 550.0$
shikonin standard No.3	86.3	: 13.7	$[\alpha]_D^{25} = + 521.4$
shikonin standard No.4	12.0	: 88.0	$[\alpha]_D^{25} = - 364.6$

[†] These compounds were separated from shikonin standard No. 1 by chiral phase column.

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「ユーカリ葉抽出物」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 「ユーカリ葉抽出物」規格作成に関する基礎的研究を行い、同製品中に含有される化合物の化学構造を LC/MS を用いて解析し、没食子酸、エラグ酸に加え、6 種の Macrocarpal 類が含まれることを推定した。

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

「ユーカリ葉抽出物」は、既存添加物名簿収載品目リストに、「フトモモ科ユーカリ(*Eucalyptus globulus* LABILL)の葉より、水蒸気蒸留して得られたもの、又はエタノールで抽出して得られたものである。有効成分はβ-ジクトン類である。」と記載されている(既存添加物名簿番号, 456)。基原植物であるユーカリノキ(*Eucalyptus globulus* Labill., 英名: Tasmanian Blue Gum)はオーストラリア原産で、世界各地の温暖な地域で栽培される常緑高木である。薬効としては、葉の成分が抗菌作用、駆虫作用、去痰作用が示される他に、関節痛、陽炎、火傷、湿疹などに対する抗炎症作用も認められている。食品添加物としての用途は、油脂系食品への酸化防止剤と考えられる。主成分と考えられるエラグ酸は、「ユーカリ葉抽出物」と別途に食品添加物として登録され(既存添加物名簿番号, 56)、果実などの天然食品中に常在成分として含有されている。本研究では、公的な成分規格のない既存添加物「ユーカリ葉抽出物」の規格作成に関する基礎的検討を行うため、平成 11 年度に変異原性試験の行われた「ユーカリ葉抽出物」製品を入手し、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 「ユーカリ葉抽出物」は日本食品添加物協会を通じて入手した。没食子酸一水和物、エラグ酸二水和物は和光純薬工業社製の一級品及び生化学用を購入した。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。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。

カラム: LiChrosphere 100 RP-18 (5 μm, 4 x 250 mm, Merck 社製), 移動相 A: 5 %酢酸, 移動相 B: メタノール, リニア溶出グラジエント: 0%B (0 分); 50%B (30 分); 85%B (35-40 分); 90%B (50 分), 100%B (55-70 分), 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出波長: 紫外 270 nm.

LC/MSはJEOL AccuTOFを用いた。測定は試料をLCより導入し、大気圧化学イオン化(atmospheric pressure chemical ionization: APCI)法によりイオン化を行い、positive ion mode及びnegative ion modeで測定した。なお、測定条件としてオリフィス電圧 85 Vもしくは-60 V、リングレンズ電圧 10 Vもしくは-11 V、質量範囲 100~700 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。

化合物の分画 「ユーカリ葉抽出物」粉末 100 gを n -ヘキサン、酢酸エチル、 n -ブタノールで順次抽出した。得られた n -ブタノール抽出液及び酢酸エチル抽出液を濃縮した後、HP-20 カラム (60 x 350 mm)に供し、20%~100%のメタノール濃度勾配で溶出させて分画した (Fig. 1)。分取 HPLCは下記条件で測定した。

カラム: Inertsil ODS-3 (20 x 250 mm, または 4.6 x 250 mm), 移動相: 60~90% メタノール(0.1% TFA), 流速: 9~12 mL/min, または 0.8~1.0 mL/min, カラム温度: 40°C。

C. 研究結果

「ユーカリ葉抽出物」のメタノール抽出物を HPLC に供したところ、複数のピークが確認された。それらのうち化合物 A 及び B は、それぞれ没食子酸、エラグ酸標準品のピークと保持時間が一致した (Fig. 2)。化合物 B は精密質量分析の結果、 $[M+H]^+$ に対応する m/z 303.06691 を与え、推定組成式 $C_{14}H_6O_3$ を導き、エラグ酸と同定した。没食子酸と考えられる化合物 A は、分子量 (170.12, $C_7H_6O_3$) の小ささが影響を及ぼし、LC/MSを用いた同定が困難であった。

次に、酢酸エチル抽出液を濃縮後、カラムクロマトグラフィー及び分取 HPLCを用いて粗分画した。Fig. 2に示すクロマトグラムの保持時間 36~52 分に溶出される化合物が含まれる画分を分画し、LC/MSを用いて精

密質量分析を行い、これまでの文献情報と合わせて、それら化合物の化学構造を推定した。同画分の全吸収イオン強度クロマトグラムを Fig. 3に、化合物 C~H のマススペクトルを Fig. 4~9に示す。化合物 C は精密質量分析の結果、 $[M-H]^-$ に対応する m/z 485.24928 を与え、推定組成式 $C_{28}H_{38}O_7$ を導き、文献情報より Eucalyptone と推定した (Fig. 4)。また、化合物 H は精密質量分析の結果、 $[M-H]^-$ に対応する m/z 453.26410 を与え、推定組成式 $C_{28}H_{38}O_5$ を導き、Macrocarpal C と推定した (Fig. 9)。

化合物 D~G は精密質量分析の結果、 $[M-H]^-$ に対応する m/z 471.29219, 471.29366, 471.29255, 471.28991 を与え、同一の推定組成式 $C_{28}H_{40}O_6$ を導いた (Fig. 5~8)。質量電荷比範囲 471-472 のマスキロマトグラムを Fig. 10 に示す。これらの化合物は、本研究と同じ条件で分析した既報の HPLC 溶出順から、化合物 D を Macrocarpal A, 化合物 E を Macrocarpal B, 化合物 F を Macrocarpal D, 化合物 G を Macrocarpal E と推定した。

本研究において同定、推定された「ユーカリ葉抽出物」由来 8 化合物の化学構造を Fig. 11 に示す。

D. 考察

「ユーカリ葉抽出物」は、既存添加物収載品目リストに酸化防止剤として、「フトモモ科ユーカリ (*Eucalyptus globulus* LABILL) の葉より、水蒸気蒸留して得られたもの、又はエタノールで抽出して得られたものである。有効成分は β -ジケトン類である。」と記載されている。本研究の結果、「ユーカリ葉抽出物」に含まれる化合物は没食子酸、エラグ酸に加え、数種 Macrocarpal 類であることが推定された。上記の研究結果をふまえ、既存添加物収載品目リストの記載事項をより正確にするため、一部改訂するべきであるかもしれない。また今後、さらに化合物を単離精製し、詳細な構造情報を明らかにする予定である。植物体に含有される抗酸化活性を示

す二次代謝物は多岐に渡る。本研究で同定された化合物の抗酸化能の解明も今後の検討課題であると考えられる。

E. 結論

既存添加物「ユーカリ葉抽出物」製品に含まれる化合物として、没食子酸，エラグ酸の他，数種 *Macrocarpal* 類の存在を明らかにした。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

参考文献

Y. Amakura, Y. Umino, S. Tsuji, H. Ito, T. Hatano, T. Yoshida and Y. Tonogai, *Food Chemistry*, **77**, 47-56 (2002).

Y. Yamakoshi, M. Murata, A. Shimizu and S. Homma, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1570-1576 (1992).

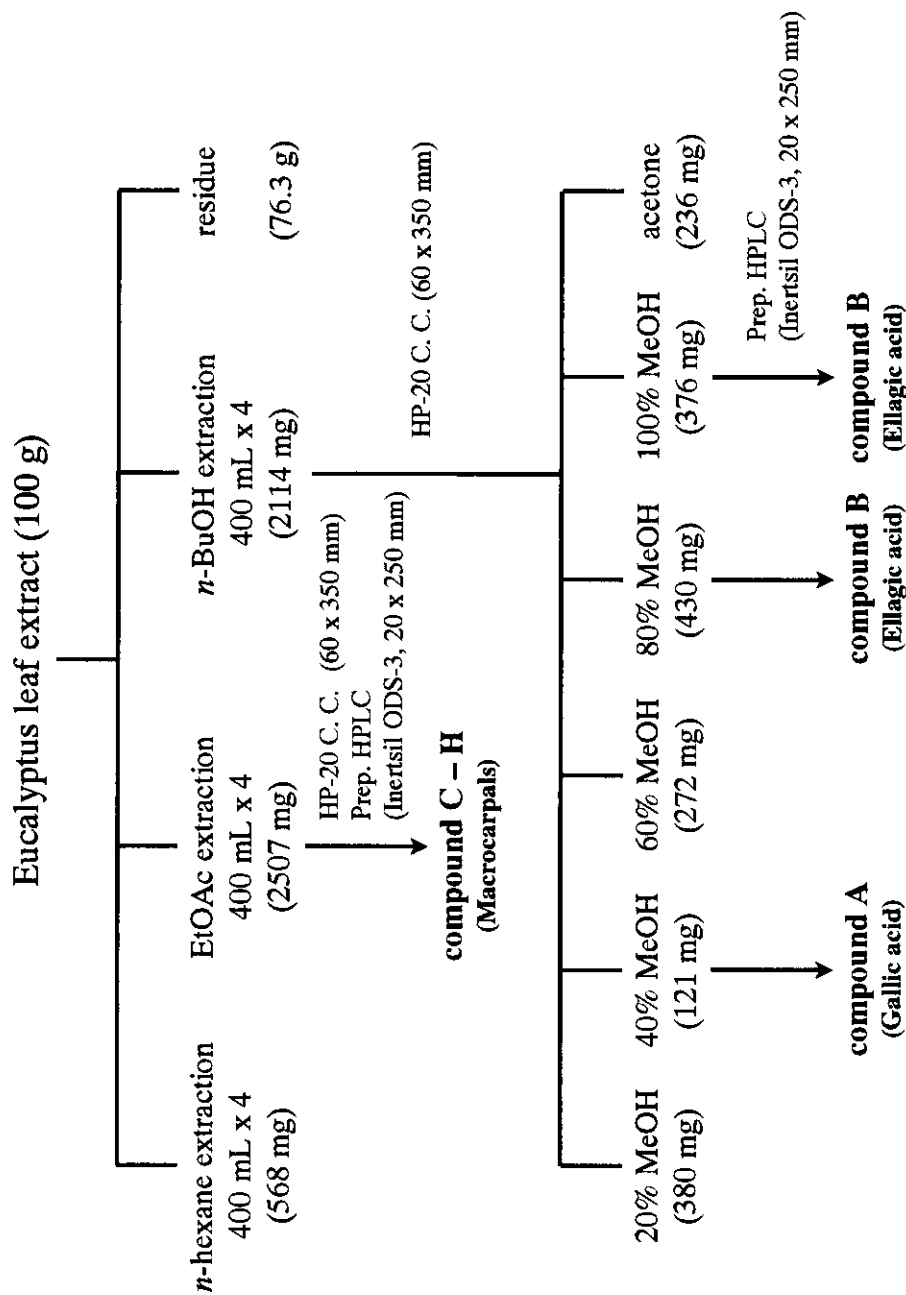


Fig. 1 Preparation of Gallic acid, Ellagic acid and Macrocarpals from Eucalyptus leaf extract

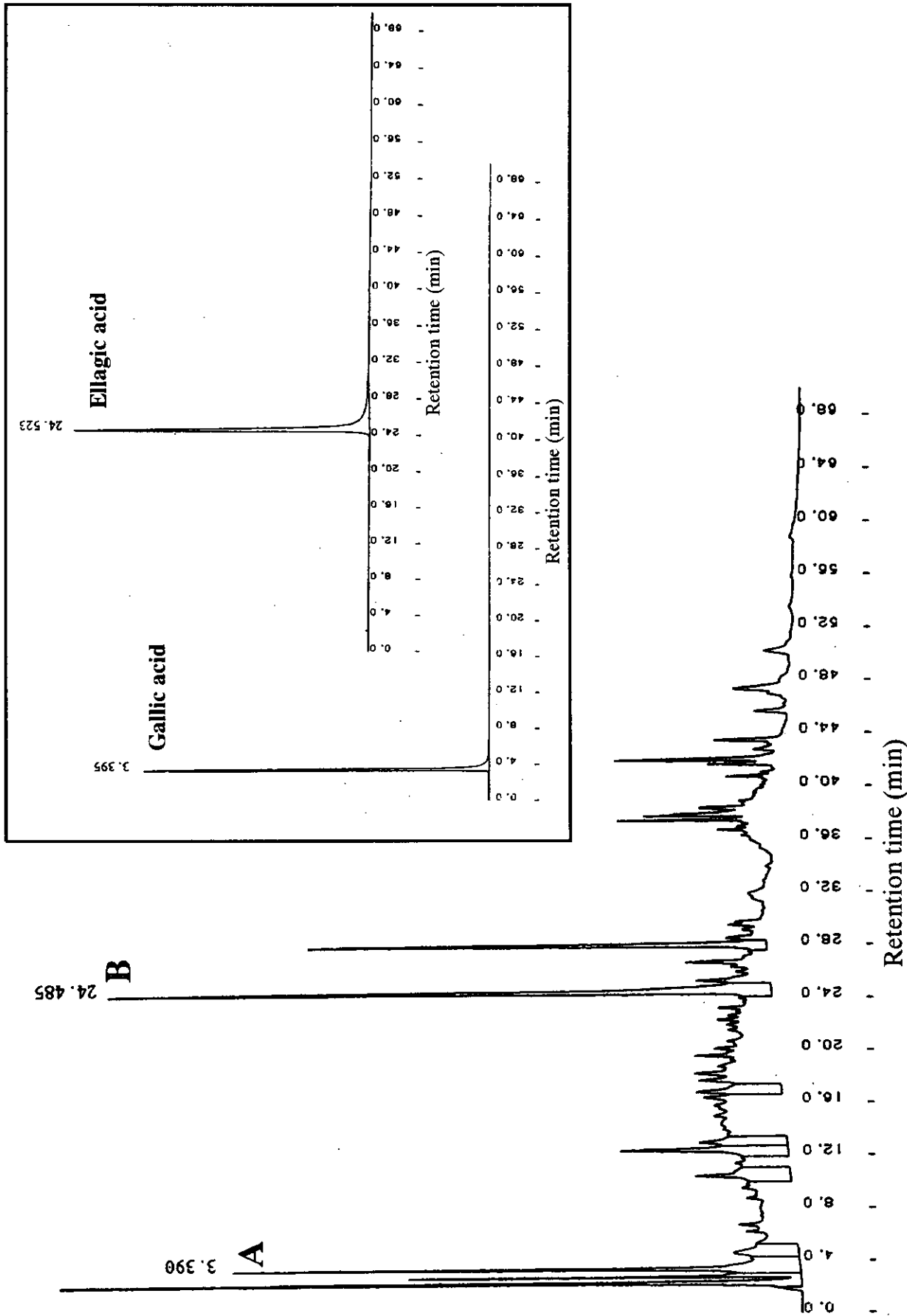


Fig. 2 Chromatogram of methanol extract of Eucalyptus leaf extract

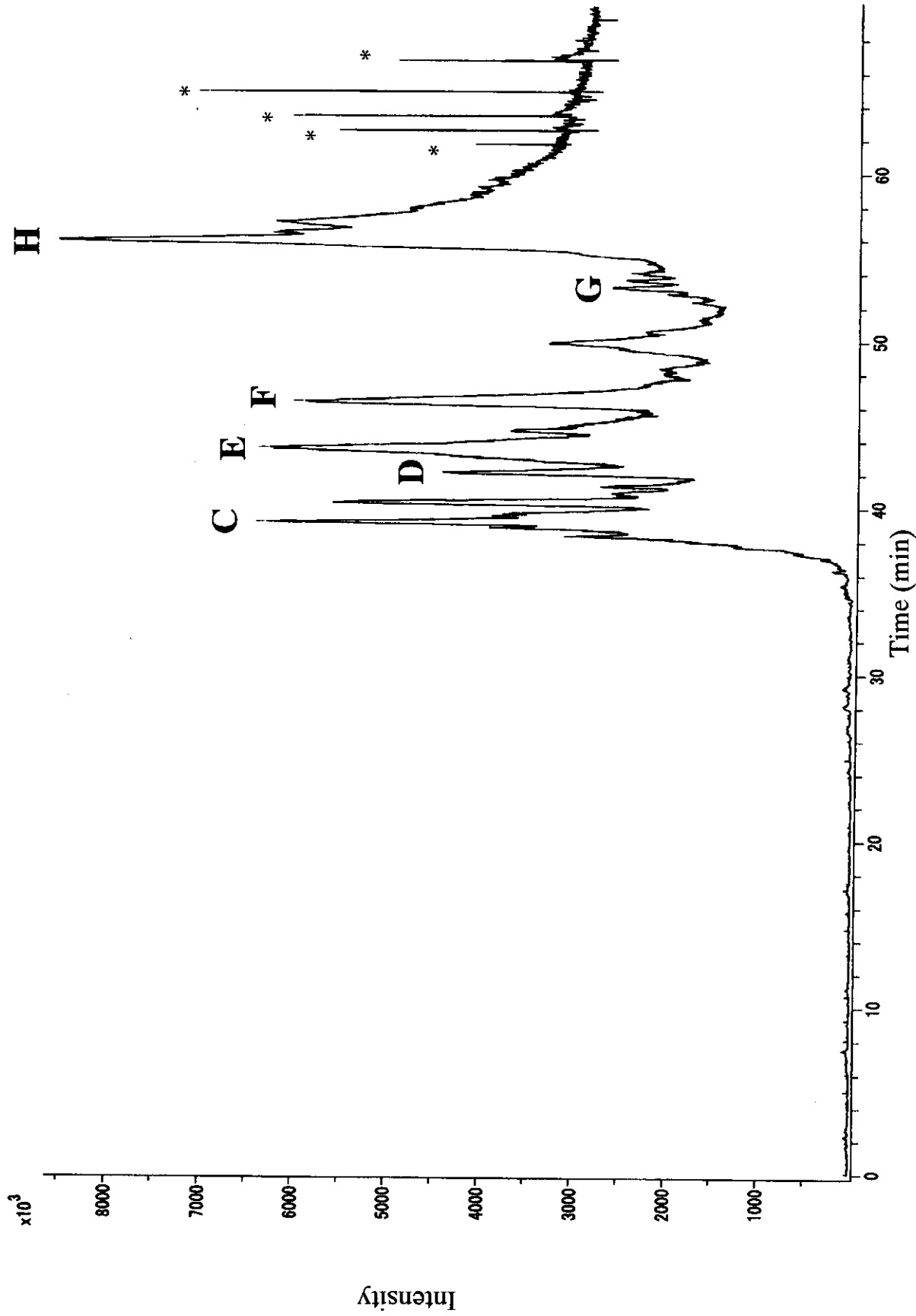


Fig. 3 Total ion chromatogram of EtOAc extract of Eucalyptus leaf extract

*; internal standard.

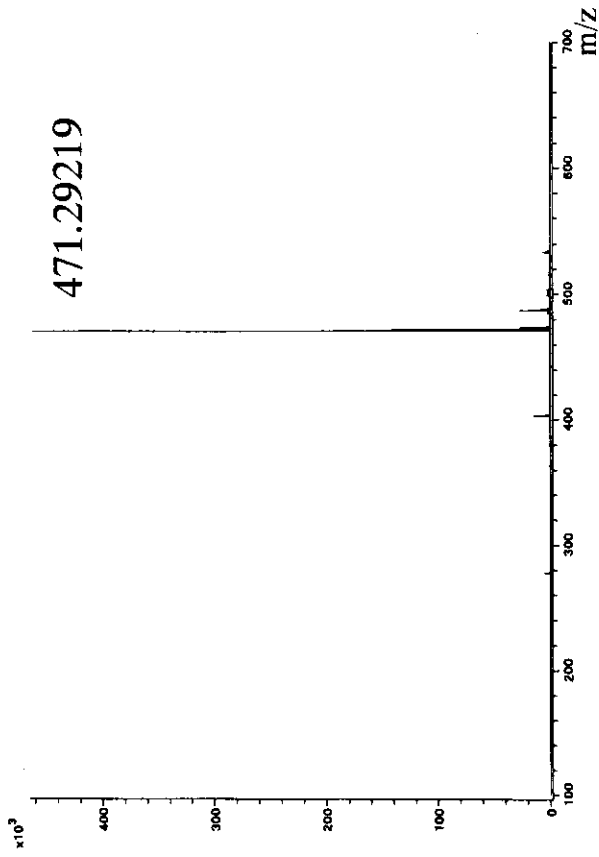


Fig. 5 Mass spectrum of compound D (Macrocarpal A)

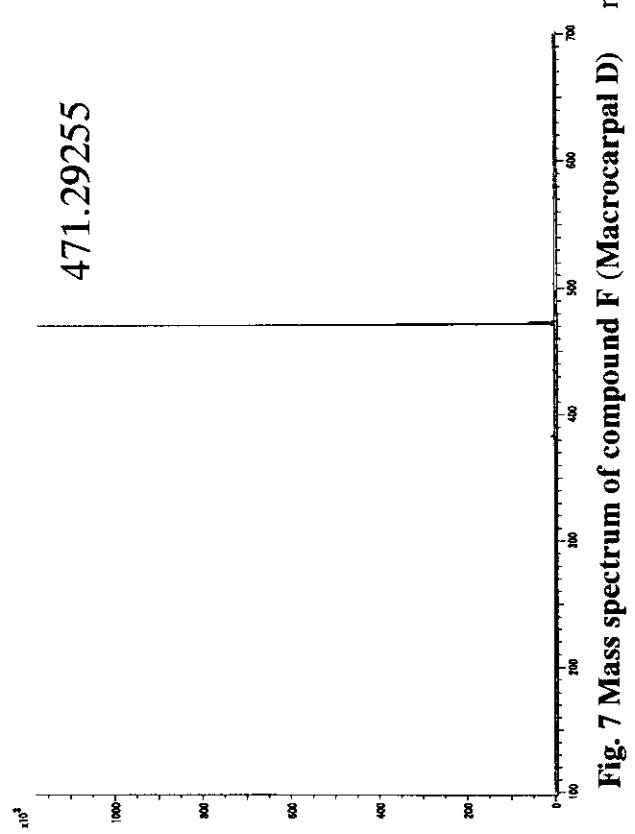


Fig. 7 Mass spectrum of compound F (Macrocarpal D)

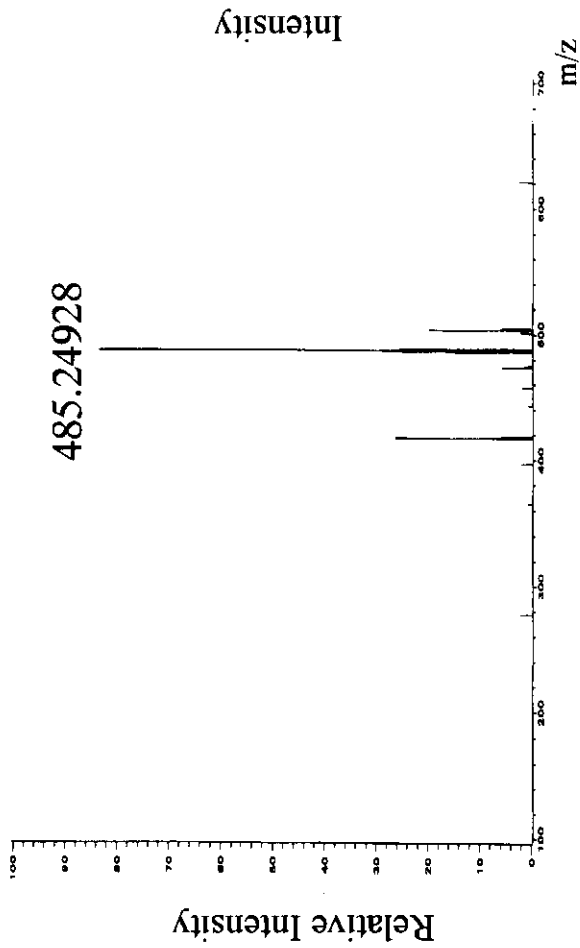


Fig. 4 Mass spectrum of compound C (Eucalyptone)

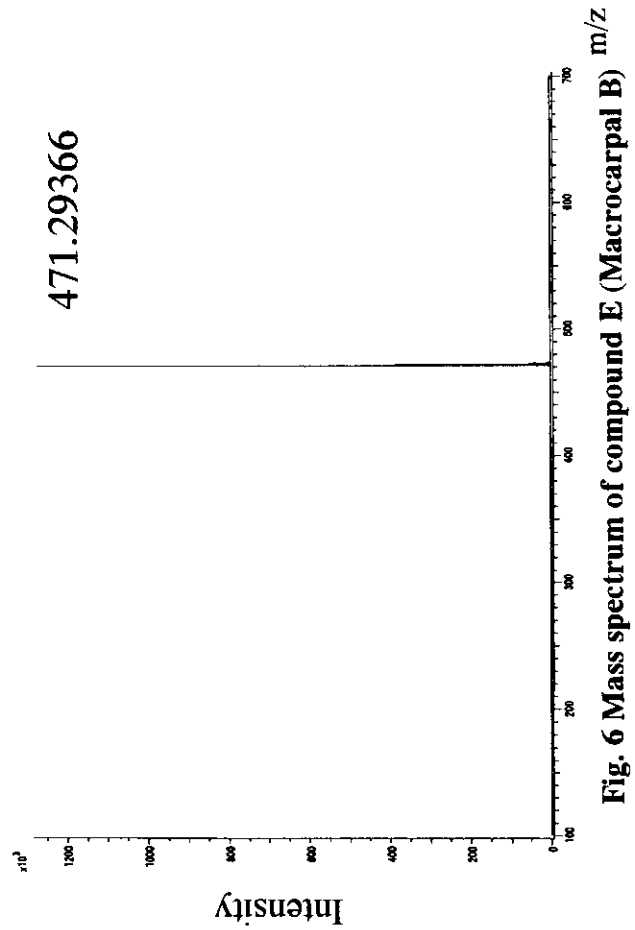


Fig. 6 Mass spectrum of compound E (Macrocarpal B)

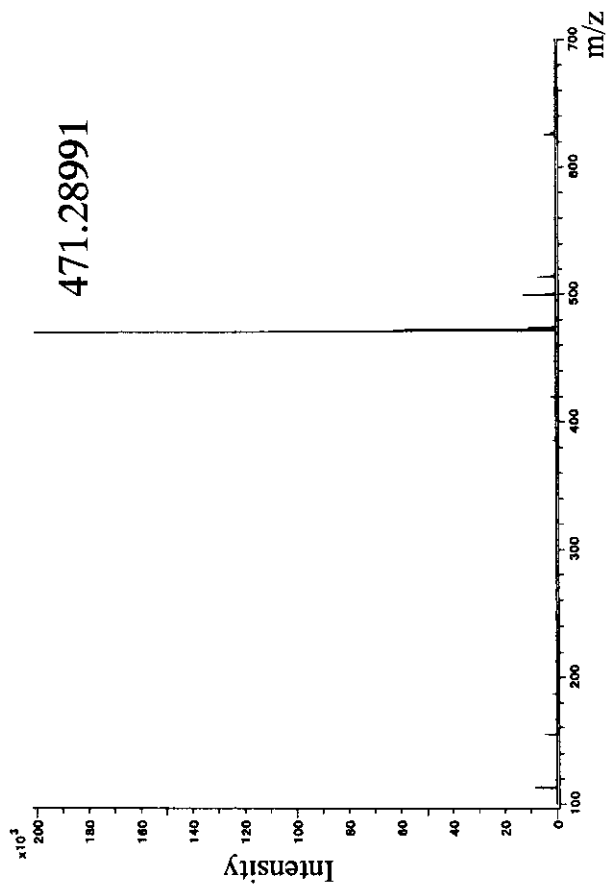


Fig. 8 Mass spectrum of compound G (Macrocarpal E)

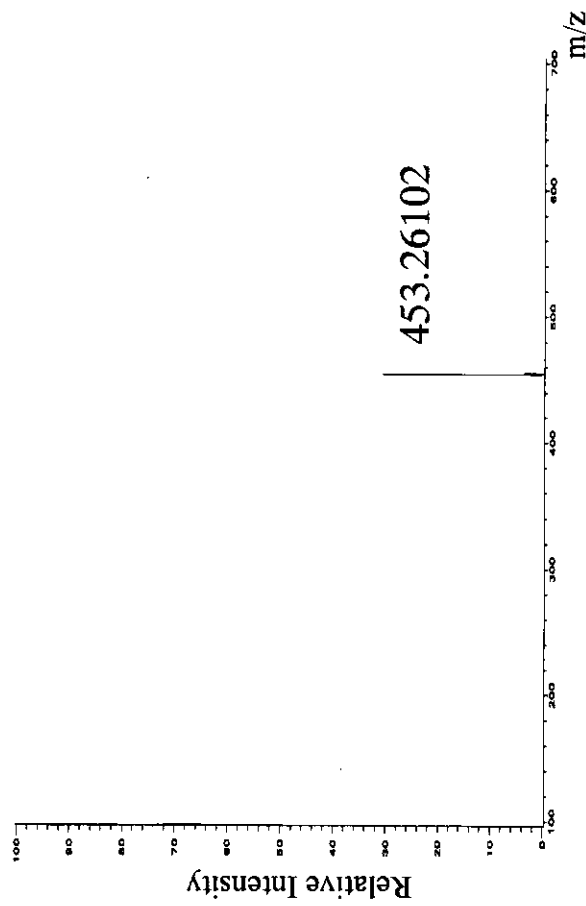


Fig. 9 Mass spectrum of compound H (Macrocarpal C)

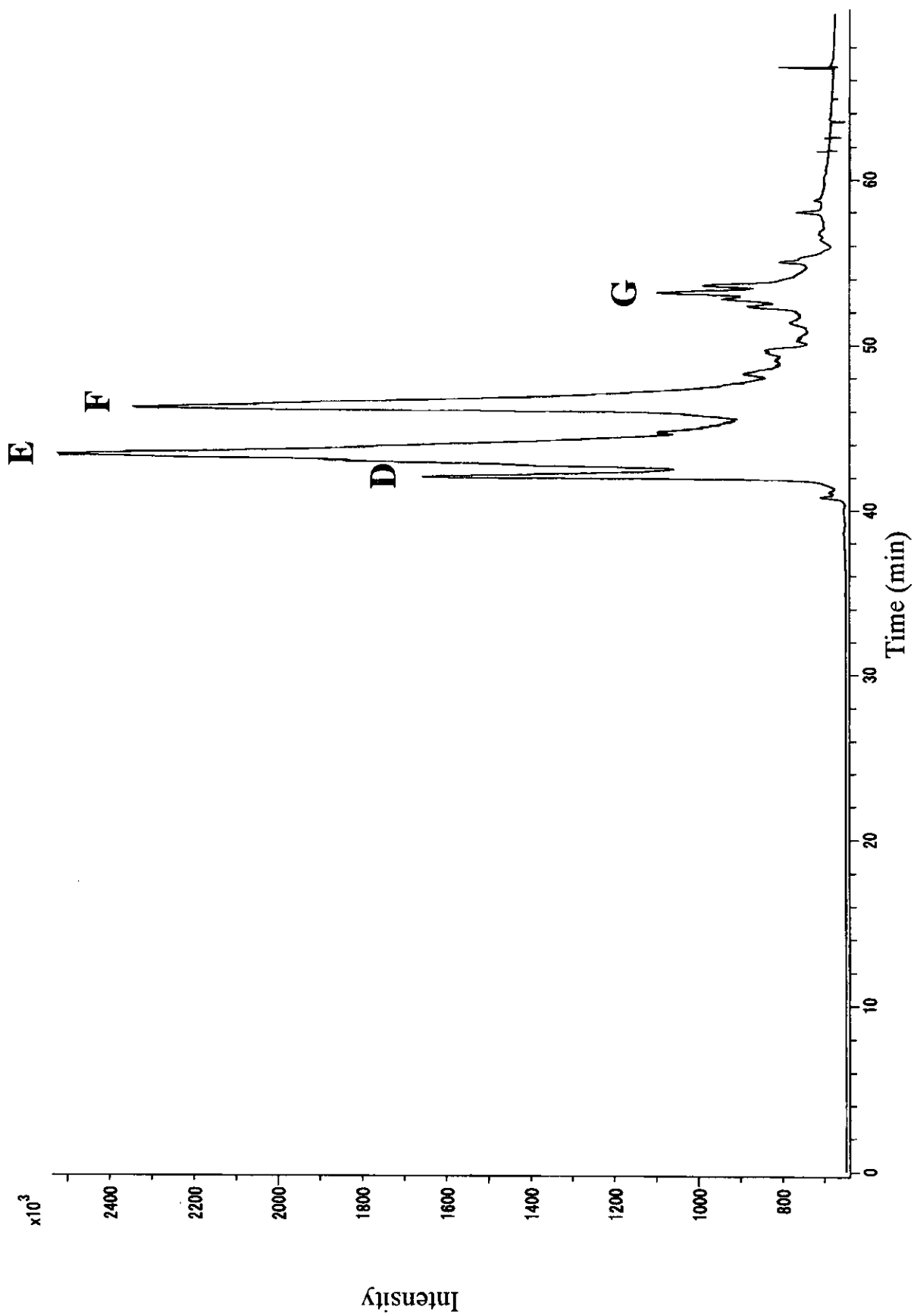


Fig. 10 Mass chromatogram of ethyl acetate extract at m/z 471-472

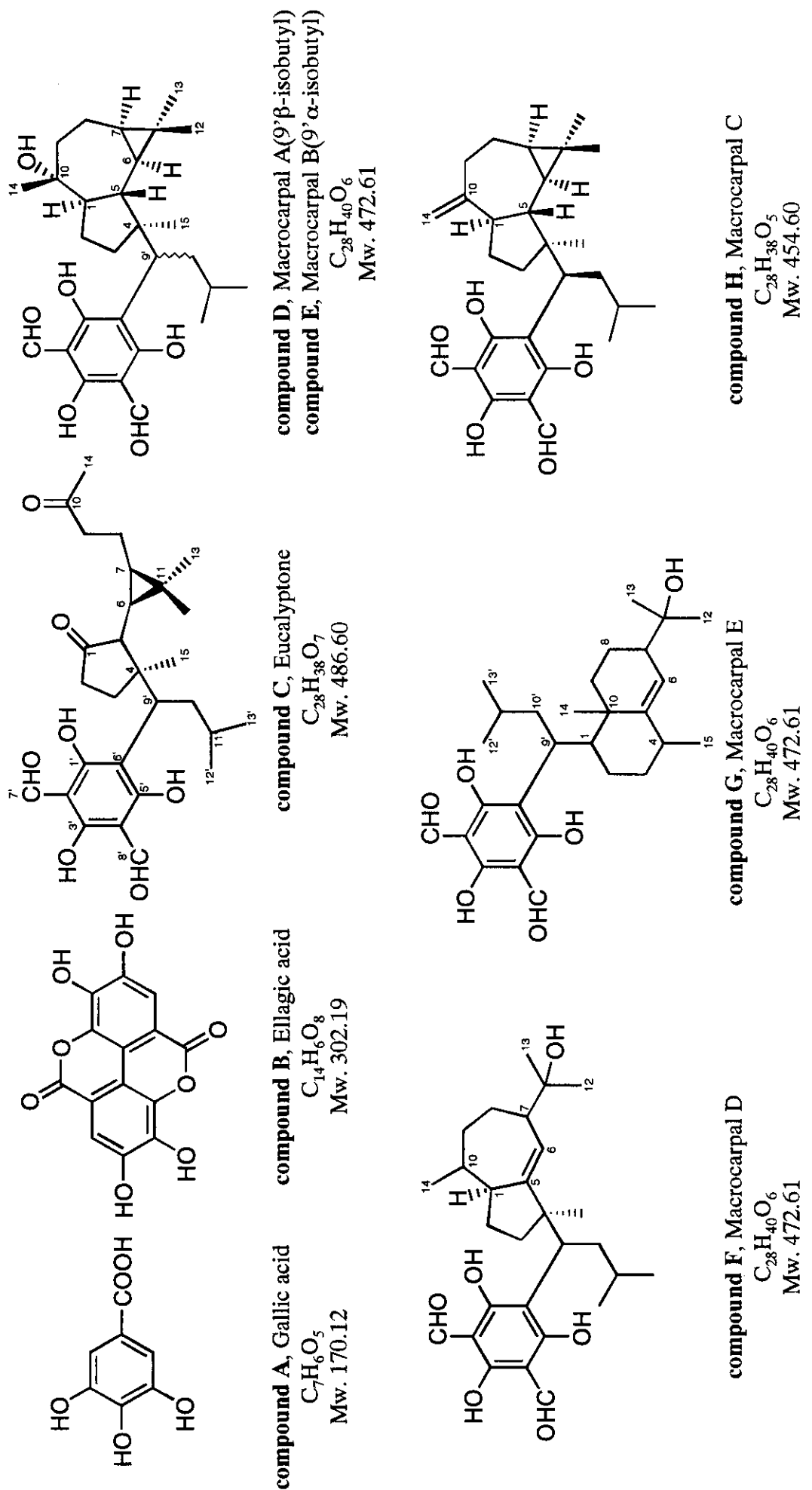


Fig. 11 Chemical structures of compounds from Eucalyptus leaf extract

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
平成15年度分担研究報告書

グレープフルーツ種子抽出物の成分に関する研究

分担研究者 黒柳 正典 広島県立大学生物資源学部 教授

研究要旨；今年度分析を行った2つのサンプルのうち、GFE-IIは2つの不飽和脂肪酸(オレイン酸およびリノール酸)が主成分であった。GFE-IIIからはアルキル鎖がC8-C18のベンザルコニウムが検出された。

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

A. 研究目的

既存添加物の安全性評価及び規格基準の設定に有用な基礎的な情報を提供するために、既存添加物中の成分を明らかにし、生理活性や毒性等の評価を行うとともに、成分の分析及び分析法の確立が必要である。そこで、既に使用されているにもかかわらず上記のデータが不足している既存添加物の一つであるグレープフルーツ種子抽出物の成分について検討する。昨年度、提供された試料(GFE-I)の主成分はポリエチレングリコールの脂肪酸誘導体であったが、調査によりグレープフルーツ種子抽出物ではないものだった。これを受け、今年度は再度新たにグレープフルーツ種子抽出物2製品(GFE-IIとGFE-III)を入手し、それぞれに含有される主成分の分離構造決定を行い、これらのサンプルが既存添加物として妥当なものであるのかを判定

するための情報を得るとともに、グレープフルーツ種子抽出物の特異的主成分の分析法を確立し、その品質確保に寄与するとともに、毒性実験を行うための基礎資料の提供を目的とする。

B. 研究方法

新たに提供されたグレープフルーツ種子抽出物2製品のサンプルII(GFE-II)とサンプルIII(GFE-III)について、それぞれ約15倍量のメタノール(MeOH)に溶解し、薄層クロマトグラフィー(TLC)により分析を行った。TLCにはMerck TLC silica gel 60F₂₅₄(蛍光剤入り)を用い、GFE-IIにはCHCl₃-MeOH=20:1の展開溶媒を用い、GFE-IIIの分析にはCHCl₃-MeOH=4:1の展開溶媒を用いて分析した。両サンプルについて、TLC展開後254nm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に浸漬し、ホットプレート(160°C)上で加熱発色させた。

参考として、別に市場より入手したカプセル

剤(GFEC)についても MeOH による抽出を行い TLC により比較した。GFEC 1 カプセルの内容物を 3 mL の MeOH で加熱抽出し、その濾液を濃縮後少量の MeOH に溶解し、TLC に付した。

TLC の分析の結果に基づき、GFE-II, GFE-III それぞれのサンプルの一部を用いて分取 TLC (PLC)を行うことによりそれぞれのサンプルから含有物質を分離した。

GFE-II 200 mg を MeOH 0.5 mL に溶解し、分取用 TLC プレート (Merck, silica gel 60 F₂₅₄, 200 x 200 x 0.5 mm) 2 枚にスポットし、CHCl₃・MeOH = 15:1 の溶媒で展開した。GFE-II には単一のスポットしか認められず、このスポットは弱い UV 吸収を示すテーリングしたスポットで H₂SO₄ 加熱処理による発色で褐色に呈色することが分かっていたので、TLC 展開後 UV 照射により吸収を示す部分を掻き取って CHCl₃・MeOH = 8:1 の溶媒で抽出し化合物 GFE-II-1 を得た。

GFE-II-1 については NMR および MS の測定を行ってその化合物の構造を決定した。

一方、GFE-III もその 200 mg を MeOH を 0.5 mL に溶解し分取用 TLC プレートに 2 枚にスポットし CHCl₃・MeOH = 4:1 の溶媒で展開した。GFE-III には弱い UV 吸収を示すスポットと、そのすぐ下に、UV 吸収は示さないが、10% H₂SO₄ により赤褐色に発色するスポットが存在するため、その 2 つのスポットに対応する領域のシリカゲルを掻き取り、それぞれ、CHCl₃・MeOH = 5:1 の溶媒で抽出した。その結果弱い UV 吸収を持つ化合物 GFE-III-1 と H₂SO₄ 加熱処理で発色する化合物 GFE-III-2

を得た。

GFE-III-1 と GFE-III-2 について ¹H-NMR, ¹³C-NMR, GFE-III-1 についてはさらに二次元 NMR の測定を行った。スペクトル解析の結果 GFE-III-1 はベンザルコニウムである可能性が示唆された。そこで、GFE-III-1 がベンザルコニウムであることを確認するため、標品の塩化ベンザルコニウムの NMR を測定して、GFE-III-1 のデータと比較した。

塩化ベンザルコニウムは一般にアルキル側鎖の長さの異なるものの混合物である。このことを確認するため GFE-III-1 の高速原子イオン化質量分析 (FAB-MS) を測定した。さらに GFE-I, GFE-II, GFE-III の成分を改めて分析比較するために、高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 装置による分析を行った。GFE-I, GFE-II および GFE-III を 10 μL ずつとり、それぞれ MeOH 990 μL を加えたものを LC/MS 分析用サンプルとした。また、GFE-III についてはベンザルコニウムの定量を行うため、塩化ベンザルコニウム (試薬: 東京化成工業株式会社) 10 mg を MeOH 10 mL に溶かし、繰り返し希釈して 1.0, 0.4, 0.08 mg/mL に調製したものを検量線作成用標準試料として用いた。

LC/MS 条件: 装置; Waters LC/MS (Alliance 2965 with ZQ4000). LC 条件: column; Waters Xterra RP-18 4.6x100 mm, 5 μm, flow rate; 0.3 mL/min, solvent; H₂O-CH₃CN-1% HCOOH = 59:40:1 (0 min) - 0:99:1 (20 min) - 0:99:1 (30 min), PDA; 191-600 nm, inject; 5.0 μL. MS 条件: source temperature, 120°C; desolvation temperature,

350°C; desolvation gas, 350 L/h; cone gas, 50 L/h; capillary, 3.0 kV; cone, 30 (pos.), -50 (neg.) V; scan range ESI negative mode m/z 100-1500.

C. 研究結果及び考察

TLC による比較で、GFE-II, GFE-III はお互いに完全に異なる TLC パターンを示し、いずれも別に入手した健康食品として流通しているカプセル剤 (GFEC) の TLC パターンとも異なっていた。GFE-II, GFE-III, GFEC の TLC による比較を図 1 に示す。

GFE-II (200 mg) からは化合物 GFE-II-1 (22 mg) を得た。この化合物の $^1\text{H-NMR}$ の解析結果からトリプレットのメチル基と数多くのメチレン、オレフィンプロトンの存在が、 $^{13}\text{C-NMR}$ の結果からは多くのアルカン炭素、オレフィン炭素及びカルボキシル炭素の存在が明らかとなり、不飽和結合を有する長鎖脂肪酸であることが推定された。LC/MS の結果 GFE-II-1 は 2 種類の化合物の等量混合物で、お互いに 2 マスユニット異なっていることと、それぞれの ESI-MS (negative) の擬分子イオン $[\text{M-H}]^-$ (m/z 281 および m/z 279) から、それぞれオレイン酸およびリノール酸と推定された。

GFE-III (150 mg) からは GFE-III-1 (12 mg) および GFE-III-2 (55 mg) が得られた。GFE-III-2 は NMR データからグリセロールであることが推定され、標品との直接比較により同定した。その収量からも、また、GFE-III の濃縮とポンプによる乾燥重量の結果 (乾燥後の 78% が残存) から、50% 以上のグリセロール

が添加されていることが推測された。

GFE-III-1 は $^1\text{H-NMR}$ データからトリプレットのメチル基、多くのメチレンが重なったシグナル、トリプレットのメチレンシグナル、3.02 ppm のシングレットのメチル基、芳香環プロトンシグナルが認められる。 $^{13}\text{C-NMR}$ データから高磁場側に多くのメチルメチレンのシグナルが、ヘテロ環に結合したと考えられる 3 つの炭素シグナル、4 本の芳香環に基づくシグナルが認められる。芳香環炭素シグナルのうち 2 本のシグナルが大きなピークを示すことから対照構造を持つベンゼン環の存在が示唆される。以上のことからベンザルコニウムの構造が予想された。二次元 NMR のデータもこのことを示唆していた。そこで、塩化ベンザルコニウムの試薬 (東京化成) の NMR を測定し、GFE-III-1 のものと比較した結果、GFE-III-1 はベンザルコニウムであることが明らかになった。GFE-III-1 および塩化ベンザルコニウムの $^1\text{H-NMR}$ を図 2 に、 $^{13}\text{C-NMR}$ を図 3 に示す。

GFE-III-1 の FAB-MS データにおいて、お互いに 28 マスユニット異なる 4 つのピーク (m/z 304, m/z 332, m/z 360, m/z 388) が認められ (図 4)、これらは丁度 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ユニットずつ異なることになり、アルキル鎖の長さが $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ユニットずつ異なるアルキル鎖を持つベンザルコニウムを含んでいることが推測された。このうち、アルキル鎖の炭素数が 12 の親イオン m/z 304 が最も大きなピークを示していると考えられた。次に、LC/MS による分析においてもアルキル鎖の長さが異なるベンザルコニウムに基づくと思われる 6 つのピーク

(A~E, および保持時間 4.5 分に観察されるピーク)が確認でき、それぞれのピークに対する MS において $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ユニット差による異なる擬分子イオン $[\text{M}\cdot\text{H}]$ が観測された。この結果からからもアルキル鎖の炭素数が 12 のベンザルコニウムが主成分であることが明らかになった (図 5)。

試薬塩化ベンザルコニウムを用いて絶対検量線 (検出波長 UV 210 nm, $y = 353091x+476.845$, $r^2 = 1.000$) を作成し, GFE-III 中のベンザルコニウムを定量した結果、塩化ベンザルコニウム (アルキルの長さの異なるものの和) として 11.8% となった。

GFE-I, GFE-II, GFE-III の HPLC を比較した結果、TLC における場合と同様に、お互い共通点は全く認められず、そのクロマトグラムパターンが完全に異なっていることが明らかで

あった (図 6)。

D. 結論

今年度分析を行った 2 つのサンプルのうち、GFE-II はグレープフルーツ種子そのものにも含有されることがありうる 2 つの不飽和脂肪酸 (オレイン酸およびリノール酸) が主成分であった。

GFE-III はアルキル鎖が C8-C18 のベンザルコニウムを塩化ベンザルコニウム ($\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{ClN}$ = MW 368) として 11.8 % 含有していた。

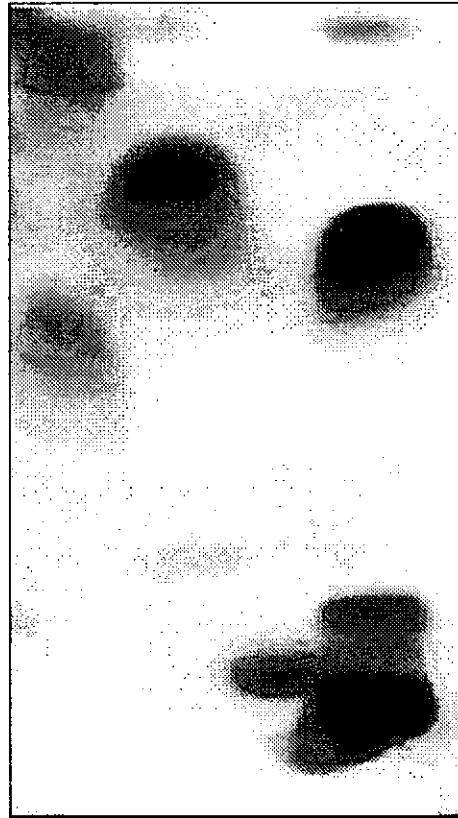
E. 研究発表

無し

F. 知的所有権の取得状況

無し

CHCl₃-MeOH-H₂O=70:10:1



GFE-I

GFE-II

GFE-III

GFEC

図1. GFE-I, GFE-II, GFE-III, GFECのTLC

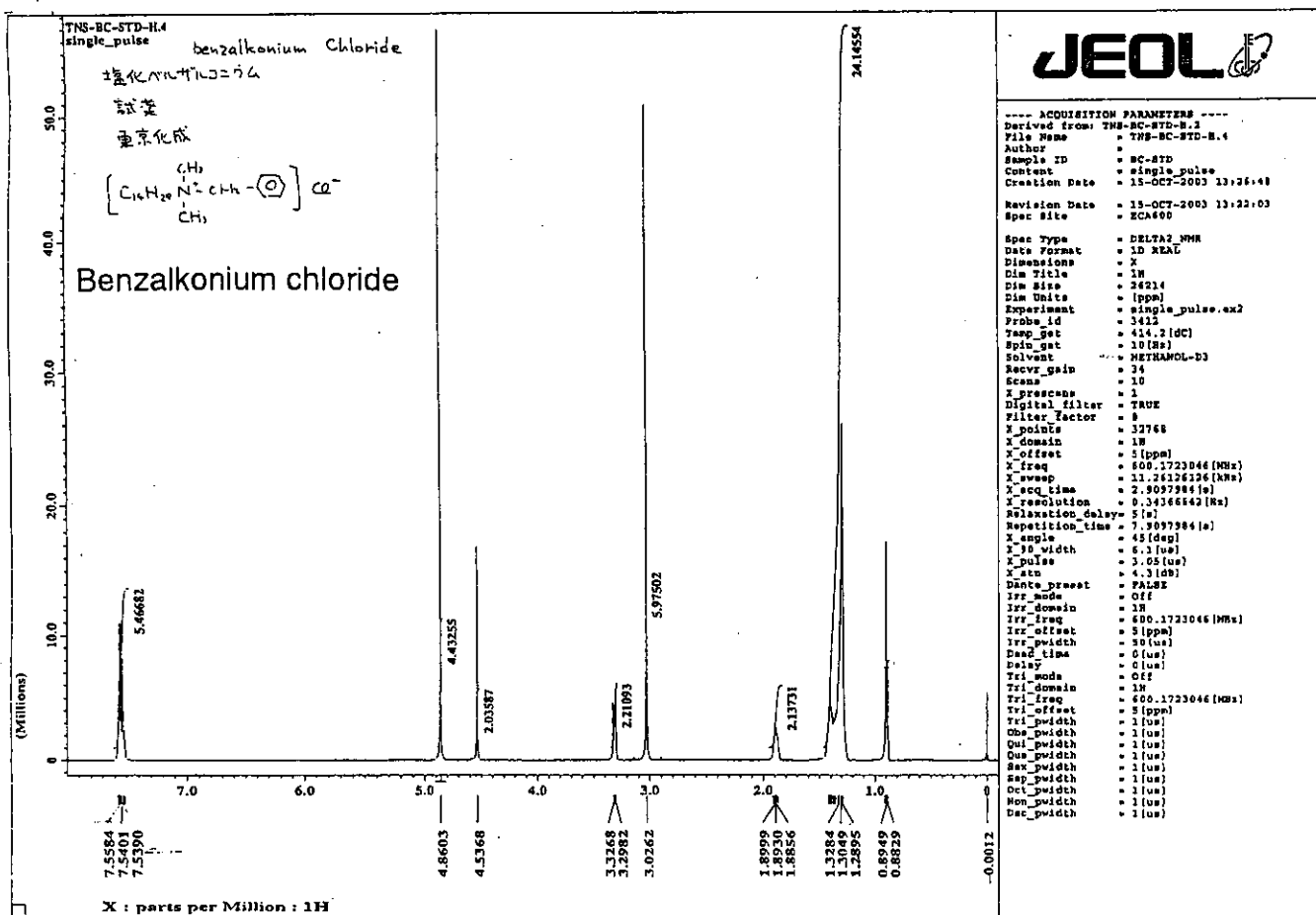
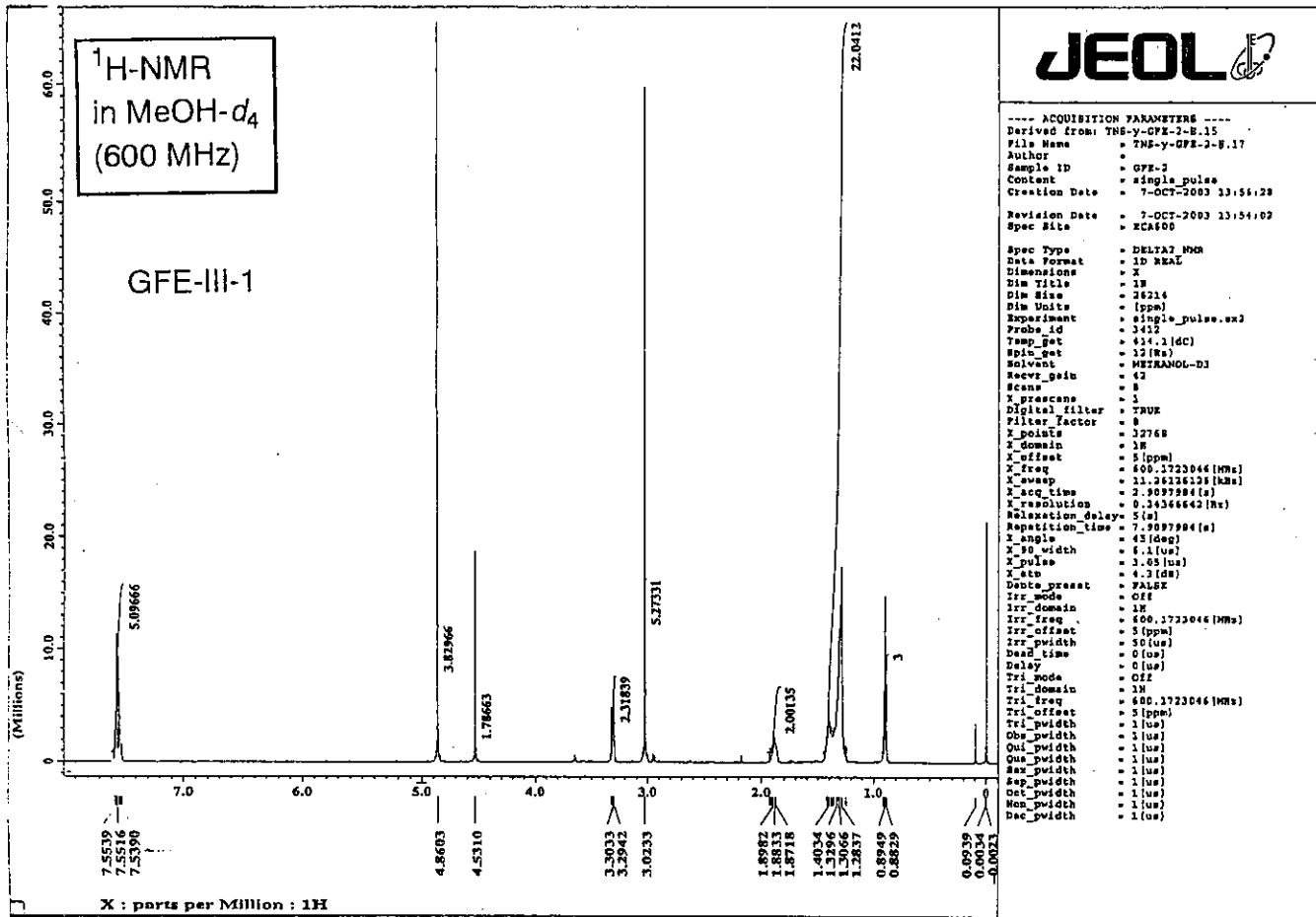


図 2. GFE-III-1 および塩化ベンザルコニウムの ¹H-NMR

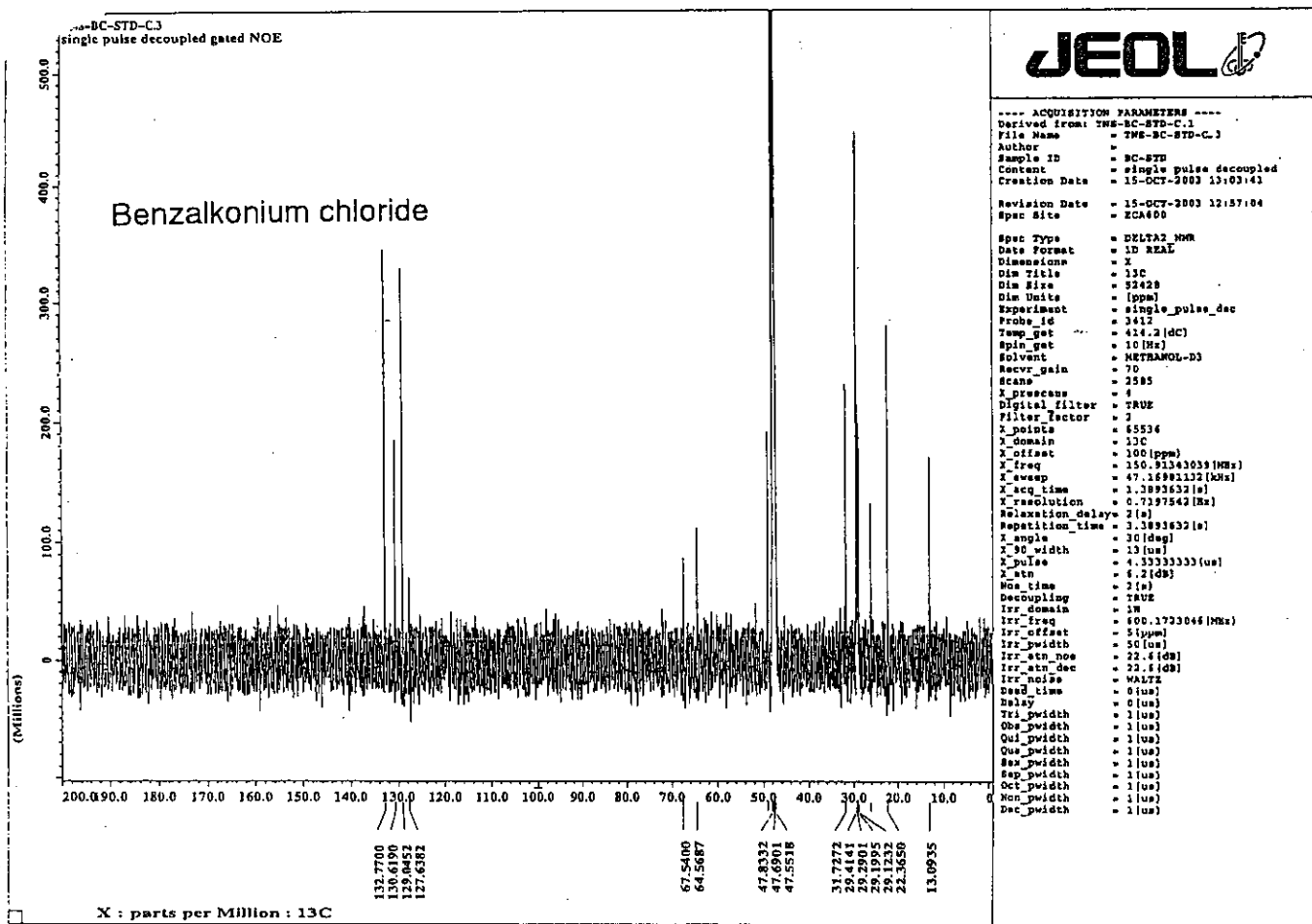
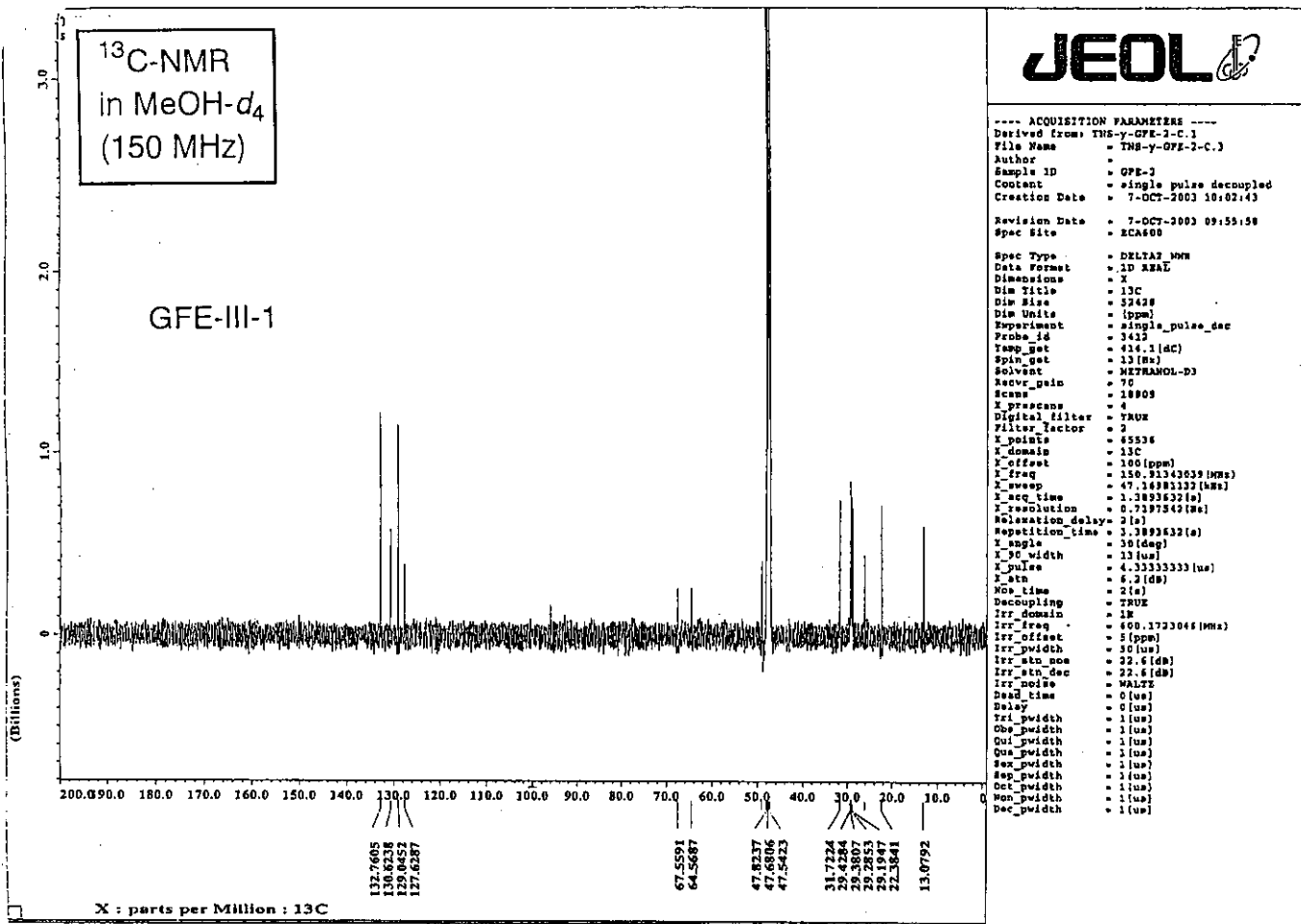


図 3. GFE-III-1 および塩化ベンザルコニウムの ¹³C-NMR

[Mass Spectrum]

Date : 17-Oct-2003 15:10

Data : FAB821

Sample: FABpos GFE1

Note : NBA

Inlet : Direct

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.84 min

BP : m/z 304.0000

Output m/z range : 10.0000 to 863.2789

12253921

Ion Mode : FAB+

Cut Level : 0.00 %

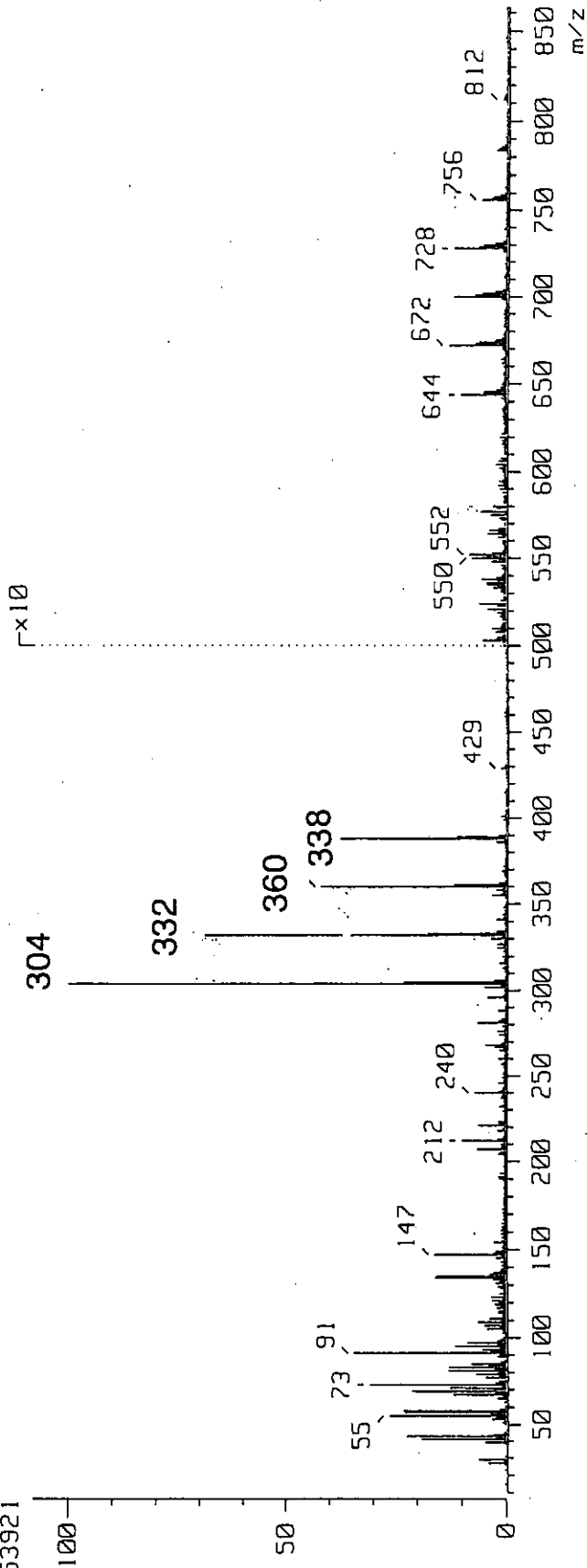


図4. GFE-II-1 の MS. 4 種類の異性体の親イオン m/z 304, 332, 360, 388

が観測される