

図5. GFE-IIIのHPLCクロマトグラムと塩化ベンザルコニウム
対応ピークのMS

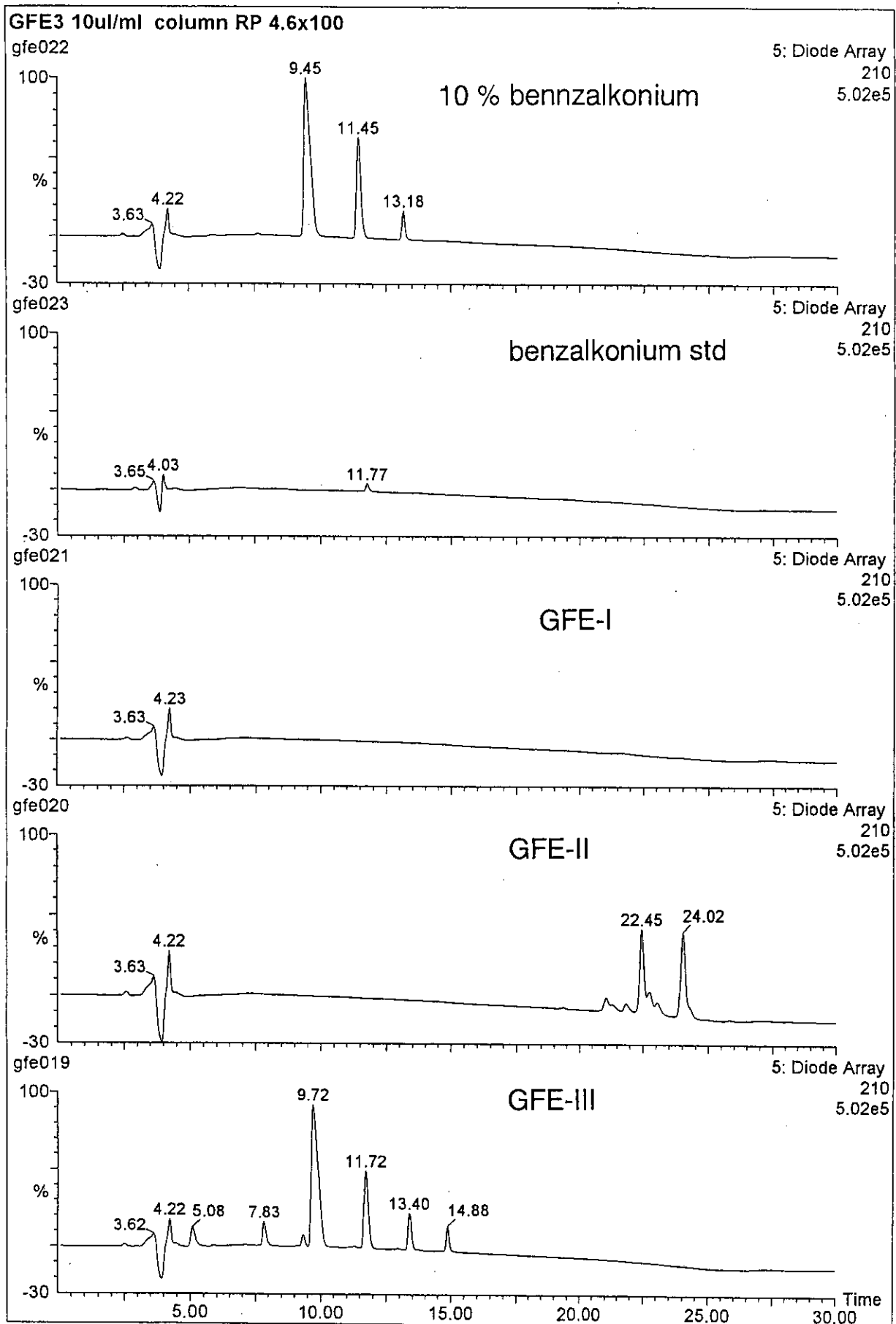


図 6. GFE-I, GFE-II, GFE-III の塩化ベンザルコニウム標準品及び塩化ベンザルコニウム消毒液成分の HPLC 比較

ヒキオコシ抽出物の成分・品質に関する研究

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；既存天然添加物であるヒキオコシ抽出物中の含有主成分を、各種分離法を繰り返し行って5つの化合物を分離した。そのうちの一つ、IJ-1 と仮称した化合物の構造を決定した。

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

既存天然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、既存天然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天然添加物の一つであり苦味料として用いられているヒキオコシ抽出物の成分について検討する。ヒキオコシ（延命草、*Isodon japonicus* Hara）の成分としては特徴的な構造を有する enmein 等のジテルペン誘導体が知られている。そこで、ヒキオコシ抽出物の特異的主要成分の分離構造決定を行い、その化学構造を明らかにし、その成分がヒキオコシの成分として妥当なものであるかどうかを検証する。このことによりこのヒキオコシ抽出物がヒキオコシを材料として製造されたものであり、

品質的に問題がないかを判断する。また、ヒキオコシに特徴的な主成分についてはその定量法の検討を行い、ヒキオコシ抽出物の品質評価法の確立に寄与することを目的とする。また、ヒキオコシ抽出物の成分を明らかにすることで毒性実験等を行うための基礎情報を提供する。

B. 研究方法

提供されたヒキオコシ抽出物製剤(10 倍散)(IJE1: 試料 1)について、それぞれ約 20 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 プレート(254 nm UV 照射でプレート面が緑色蛍光を発生し、UV 吸収を持つ物質が存在すると、そのスポット部分を陰として確認)と CHCl₃・MeOH = 20:1 の展開溶媒を用いて分析した。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 に浸漬し、ホットプレート(140°C)上で加熱発色させた。

TLCの分析の結果により、この製剤には、植物の抽出エキスに特徴的な多様な多くの成分が含有されていることが明らかになったので、大量の材料を用いて主成分の抽出分離を行った。

ヒキオコシ抽出物製剤(10倍散)(IJE2: 試料2) 310 gを酢酸エチル(AcOEt) 2 L、水(Aq.) 2 Lを用いて分液ロートによる分配抽出を行った。水相はさらにn-ブタノール(n-BuOH) 1 Lで抽出した。AcOEt抽出液及びn-BuOH抽出液は減圧下、50°Cで濃縮した。ヒキオコシの成分はほとんどAcOEt抽出液に集中していたのでAcOEt抽出液のシリカゲルカラムクロマトグラフィー(SiO₂ c.c.)を行った。SiO₂ 200 gを用い、展開溶媒としてCHCl₃・MeOH = 50:1を用い、溶出を開始し、MeOHの量を少しずつ増やして極性を上げながらクロマトグラフィーを行った。得られた50余のフラクションを、TLCの結果を基に8つのフラクションにまとめた。

この8つのフラクションのTLC結果から主成分がフラクション4(IJEA-4)に集中していることが分かり、このフラクションの結晶性が高かったのでMeOHから再結晶を行った。得られた結晶(IJEA-4C)は2つの成分(紫外吸収を持ち、硫酸・加熱により褐色に呈色するものと、紫外吸収を持たず硫酸・加熱によりピンク色に呈色するもの)が主成分であったため、この一部を用いて分取TLC(PLC)による分離を行った。IJEA-4C 150 mgをCHCl₃・MeOH混合溶媒 1.5 mLに溶かし、SiO₂プレート(Merck TLC plate silica gel 60 F₂₅₄ 200x200x0.5 mm) 4枚にスポットし、CHCl₃・MeOH = 15:1で展開し、風乾後 254 nmのUVを照射し、UV吸

収ゾーン、その直下のUV吸収無しの無着色ゾーン、その直下の橙色に着色したゾーンを掻き取り、CHCl₃・MeOH混合溶媒で抽出し溶媒を除去しそれぞれのフラクションを得た。それぞれIJ-1 (74 mg), IJ-2 (28 mg), IJ-3 (8 mg)と仮称した。IJEA-4の再結晶母液(IJEA-4M)はIJ-1, IJ-2以外の成分も含まれていたため、さらにSiO₂ c.c.による分離を行った。

IJEA-2はTLCでUV吸収を持つスポットと硫酸・加熱で弱く呈色する大きなスポットが認められたため、PLCによる分離を行った。IJEA-2 150 mgをCHCl₃・MeOH混合溶媒 1.5 mLに溶かしPLCプレート5枚にスポットし、CHCl₃・MeOH = 10:1の溶媒で展開後風乾し、UVを照射して吸収を示すゾーンと一部PLCを切り取り硫酸で発色させ現れたスポットを指標として確認したゾーンを掻き取り、CHCl₃・MeOH混合溶媒で抽出後溶媒除去してIJ-4, IJ-5と仮称する化合物をそれぞれ、13 mg, 44 mg分離した。

分離に関してはまだ途中段階であるが、以上述べた分離の流れを図1に示す。

分離したIJ-1及びIJ-2については核磁気共鳴(NMR)スペクトル法を中心とした分光データの解析により構造を検討中であるが、IJ-1についてはその構造の推定に至っている。IJ-3, IJ-4, IJ-5については純度を確認の後二次元NMRを含むNMRスペクトル、MS等の測定を行う予定である。

C. 研究結果

ヒキオコシ抽出物製剤(IJE1)のTLCの結果、

このサンプルは少なくとも植物材料エキスが含有されていることが明らかとなったため、より大量の試料からヒキオコシ抽出物中の主成分を抽出分離することが可能であると判断した。

そこで、ヒキオコシ抽出物製剤(IJE2) 310 g の溶媒分配により AcOEt 抽出物 22 g, n-BuOH 抽出物 1 g を得た。AcOEt 及び n-BuOH 抽出物を合わせた量は、23 g となり、ヒキオコシ抽出物製剤が 10 倍散であることを考えるとやや少なめではあるが、この操作で得られた量は妥当な量と考えられた。このことからヒキオコシ抽出物製剤中のヒキオコシに基づく成分を AcOEt による分配抽出により効率的に AcOEt 抽出物として抽出することができ、n-BuOH 抽出物量が極端に少ないことから、配糖体のような高極性物質はほとんど存在しないことが明らかとなった。TLC によって、この AcOEt 抽出物中には多くの化合物が存在することが明らかになったため、SiO₂ c.c.による分離を行い 8 つのフラクションを得た。この 8 つのフラクションの TLC パターンを図 2 に示す。TLC による分析の結果、IJE4-4 に主成分が存在することが明らかとなり PLC により分離を行い、IJ-1, IJ-2, IJ-3 と仮称する化合物をそれぞれ 80 mg, 27 mg, 15 mg 分離した。

IJ-1 及び IJ-2 が TLC でワンスポットを示したので、二次元 NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC)を含む NMR スペクトル及び質量分析 (MS)スペクトルの測定により構造解析を行った。IJ-1 は ¹H-NMR スペクトルにおいて、二本のシングレットメチル基[δ 1.23 (3H, s), 1.37 (3H, s)]、二本のエクソメチレン[δ 5.37 (1H, s)、

6.00 (1H, s)]、カルボニール基に共役した孤立したシスのオレフィングループ[δ 5.85 (1H, d, J = 10.0 Hz), 6.77 (1H, d, J = 10.0 Hz)]、オキシメチレングループ[δ 4.01 (1H, dd, J = 10.0, 1.7 Hz), 4.29 (1H, dd, J = 10.0, 1.2 Hz)]、二級水酸基[δ 3.95 (1H, dd, J = 12.0, 8.8 Hz)]等の存在が明らかとなった。¹³C-NMR では上記の官能基の存在を支持するとともに、二重結合と共役している二つのカルボニール基(δ 196.9, 208.3)の存在、エキソメチレングループの存在(δ 119.0, 152.5)、共役オレフィングループ(δ 161.3, 127.1)、ヘミケタールグループ(δ 95.5)、2 級水酸基(δ 73.1)、オキシメチレングループ(δ 65.6)等の存在を示している。IJ-1 は NMR データからヒキオコシから分離報告[Y. Yamada, *et al.*, *New Bitter Diterpenes, Rabdosianine I and II, Isolated from Isodon japonicus Hara, Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 524 – 529 (1999)]されている苦味物質、rabdosianone I と同一化合物と推定された。FAB-MS の測定により分子関連イオンとして Na 付加イオン m/z 367 [M+Na] C₂₀H₂₄O₅Na を与えたことより、分子式は C₂₀H₂₄O₅ と推定され rabdosianone I の分子式と一致した。さらに二次元 NMR データの詳細な解析により IJ-1 を rabdosianone I と決定した。rabdosianone I の ¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータを図 3 に示す。また、IJ-1 の構造式と ¹H-NMR, ¹³C-NMR のアサイン及び HMBC 相関について図 4 に示す。

今の時点までに、IJ-1, IJ-2, IJ-3, IJ-4, IJ-5 と仮称する 5 つの化合物を得、そのうち IJ-1 が *Isodon* 属植物に特徴的な rabdosianone I

であることを明らかにした。

D. 考察

今回提供されたヒキオコシ抽出物製剤(IJE2)の AcOEt 抽出物の TLC で、UV 吸収に関しても、硫酸・加熱発色においても様々な性質を示す多くのスポットが認められたことから、少なくとも天然物を素材として製造されたものであることを示していた。また、その AcOEt 抽出物の量から、ヒキオコシ抽出物製剤は、ヒキオコシ由来の成分を 1 割近く含むものと考えられた。分離精製実験の途中段階ではあるが、5 つの化合物を分離し、そのうちの最も主成分である IJ-1 については各種スペクトルの丹念な解析により化学構造を決定し、ヒキオコシの苦味成分として報告のある rabdosianone I であることが明らかになった。ヒキオコシの主成分として知られている enmein その他の成分についてはまだ分離構造決定にいたっていないが、ヒキオコシの特徴成分の一つが主成分として得られたことは、この製剤にヒキオコシ或いはその同属植物が基原植物として用いられたことが推測されたが、さらに、分離された残り 4 種類の化合物の構造決定と、未処理のフラクションからヒキオコシに特徴的な成分の分離構造決定することにより、この製剤がヒキオコシ抽出物として

妥当なものであるかどうかを判断することができると考える。今回分離した IJ-2 は現在 NMR, MS の測定を行っているところである。IJ-3, IJ-4, IJ-5 についても順次 NMR, MS の測定を行う予定である。

さらにいくつかの特徴的成分の分離構造決定が終了した後、代表的化合物について定量法を検討し、ヒキオコシ抽出物の既存添加物としての品質評価法の確立を行う必要がある。

E. 結論

ヒキオコシの成分としては B-sec タイプの enmein, B 環にヘミケタールを持つ oridonin タイプの誘導体が数多く報告されている。提供されたヒキオコシ抽出物製剤の AcOEt 可溶部分からヒキオコシに含まれているとの報告がある苦味物質 rabdosianone I が主成分として得られ、oridonin タイプの化合物であることが明らかになった。なお、enmein タイプの化合物が存在することを確認する必要がある。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

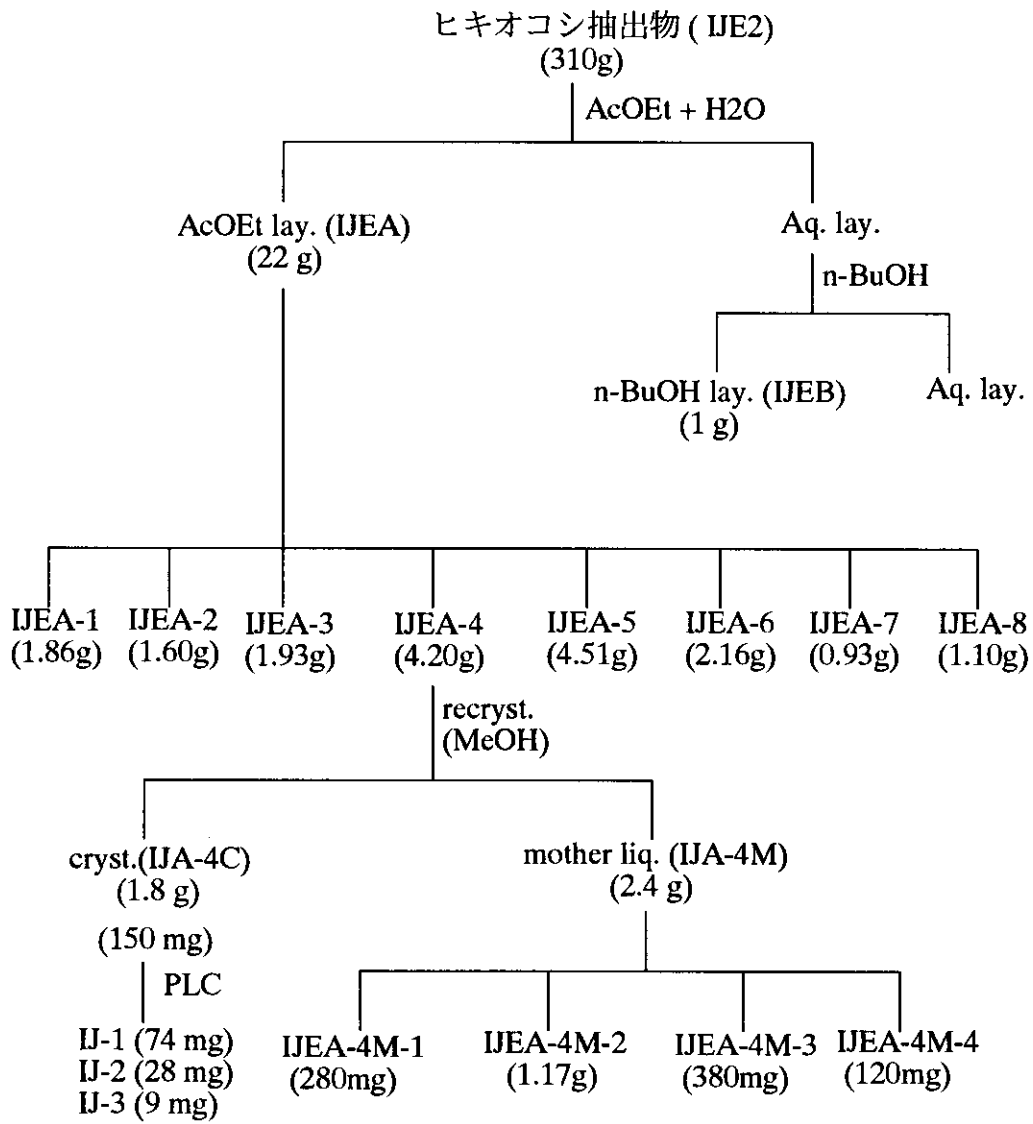


図 1. ヒキオコシ抽出物の抽出分離過程

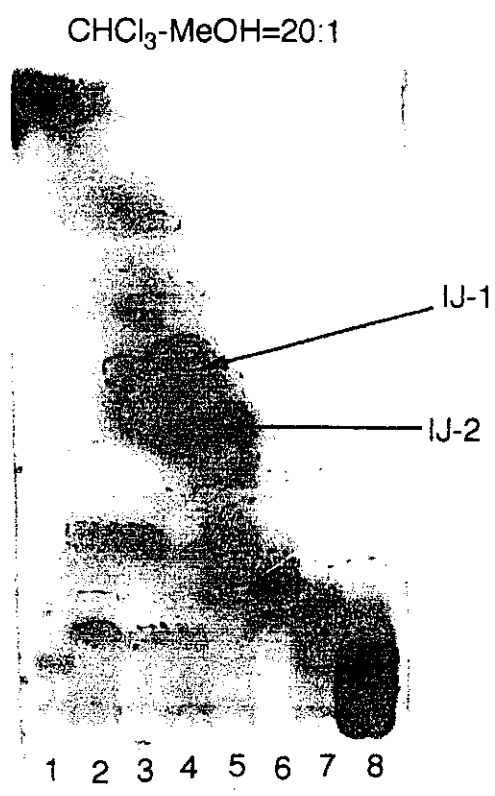
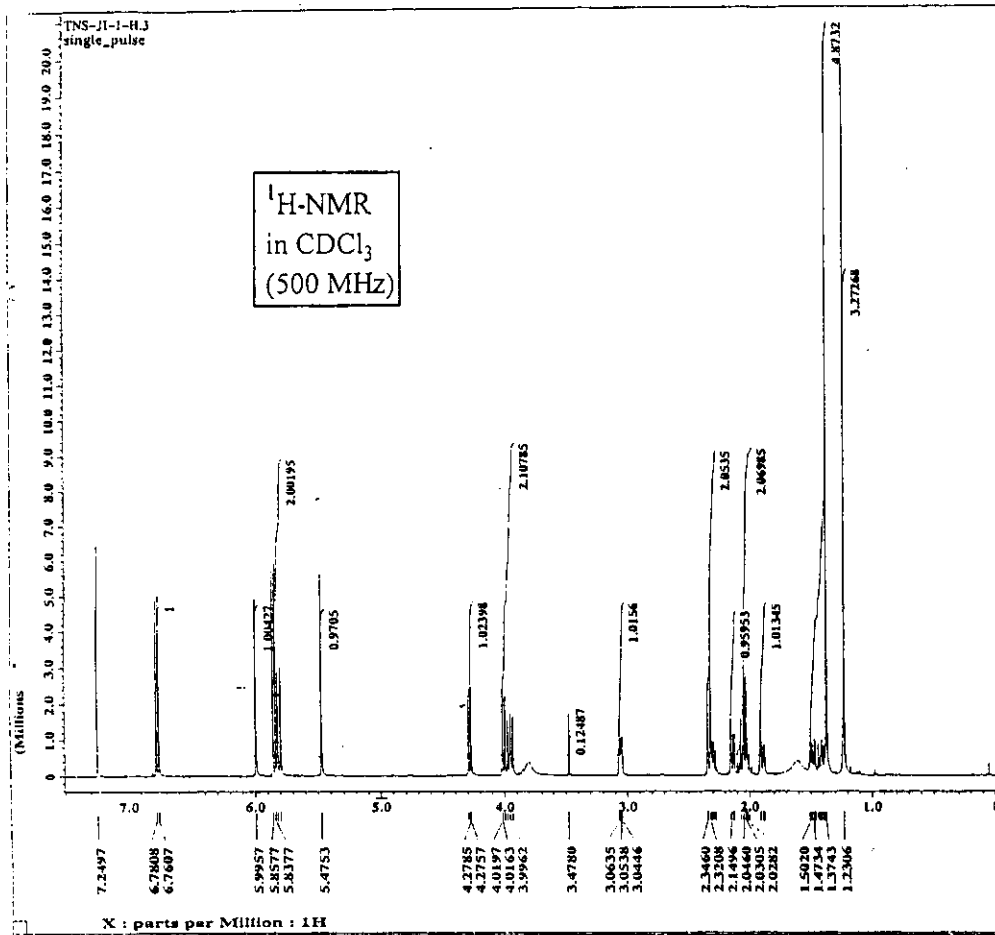


図2. IJEカラムクロマトグラフィー
のTLC



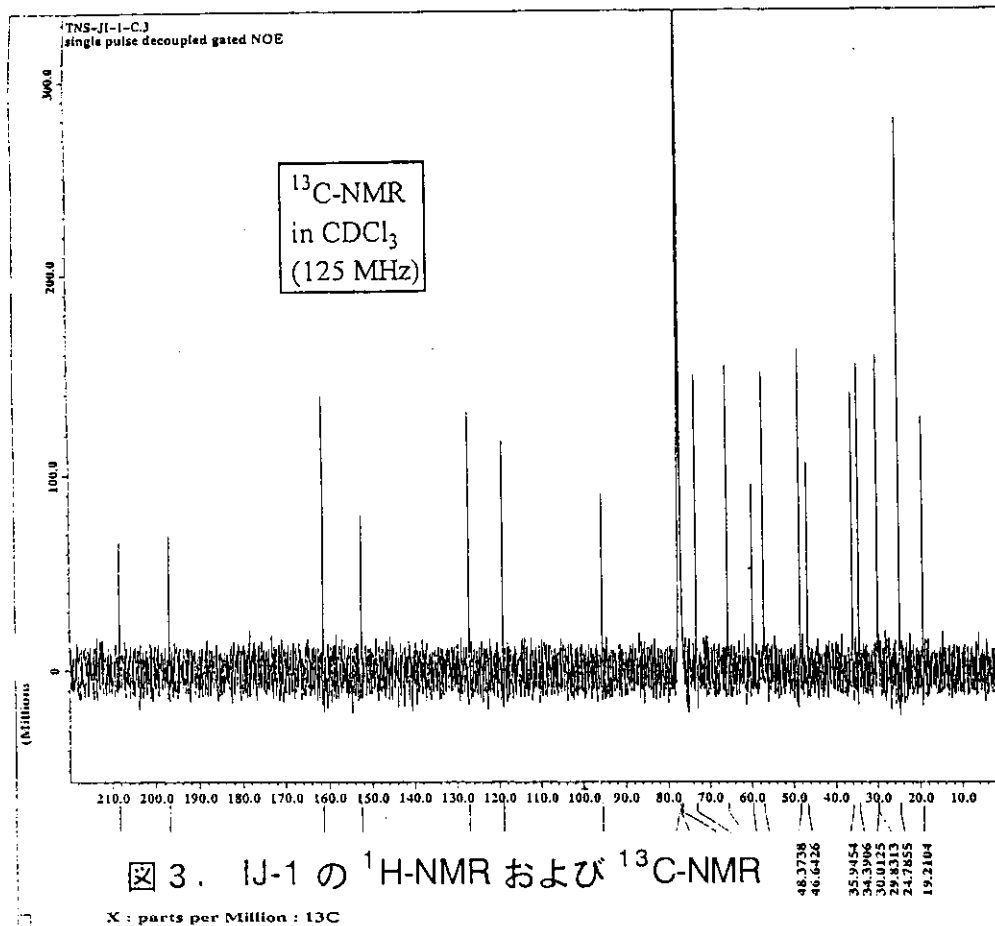
JEOL

---- ACQUISITION PARAMETERS ----

Derived from: TNS-JI-1-H.1
File Name : TNS-JI-1-H.3
Author :
Sample ID : JI-1
Content : single_pulse
Creation Date : 10-FEB-2004 16:05:43

Revision Date : 10-FEB-2004 16:13:43
Spec Site : SCAS00

Spec Type : DELTA2_NMR
Data Format : 1D COMFLX
Dimensions : X
Dim Title : 1H
Dim Size : 32214
Dim Units : ppm
Exp Date :
Experiment : single_pulse.ex1
Probe Id : 2492
Temp_get : 20.7 [dC]
Spin_get : 13 [Hz]
Solvent : CHLOROFORM-D
Recvr_gain : 54
Scans : 8
X_preproc : 1
Digital Filter : TR08
Filter Factor : 1
X_points : 32768
X_domain : 1M
X_offset : 5.0 (ppm)
X_freq : 500.13991521 (MHz)
X_sweep : 5.18186318 (kHz)
X_acq_time : 1.48175808 (s)
X_resolution : 0.28638888 (Hz)
Relaxation_delay : 5 (s)
Repetition_time : 6.49175808 (s)
X_angle : 45 (deg)
X_90_width : 13 (us)
X_pulse : 6.5 (us)
X_atn : 4 (dB)
Data_preset : PALSI
Irr_mode : OFF
Irr_domain : 1M
Irr_freq : 500.15991521 (MHz)
Irr_offset : 5.0 (ppm)
Irr_pwidth : 92 (us)
Dead_time : 0 (us)
Delay : 0 (us)
Trf_mode : OFF
Trf_domain : 1M
Trf_freq : 500.15991521 (MHz)
Trf_offset : 5.0 (ppm)
Trf_pwidth : 1 (us)
Obs_pwidth : 1 (us)
Qui_pwidth : 1 (us)
Qua_pwidth : 1 (us)
Soc_pwidth : 1 (us)
Soc_pwidth : 1 (us)
Oct_pwidth : 1 (us)
Non_pwidth : 1 (us)
Dec_pwidth : 1 (us)



JEOL

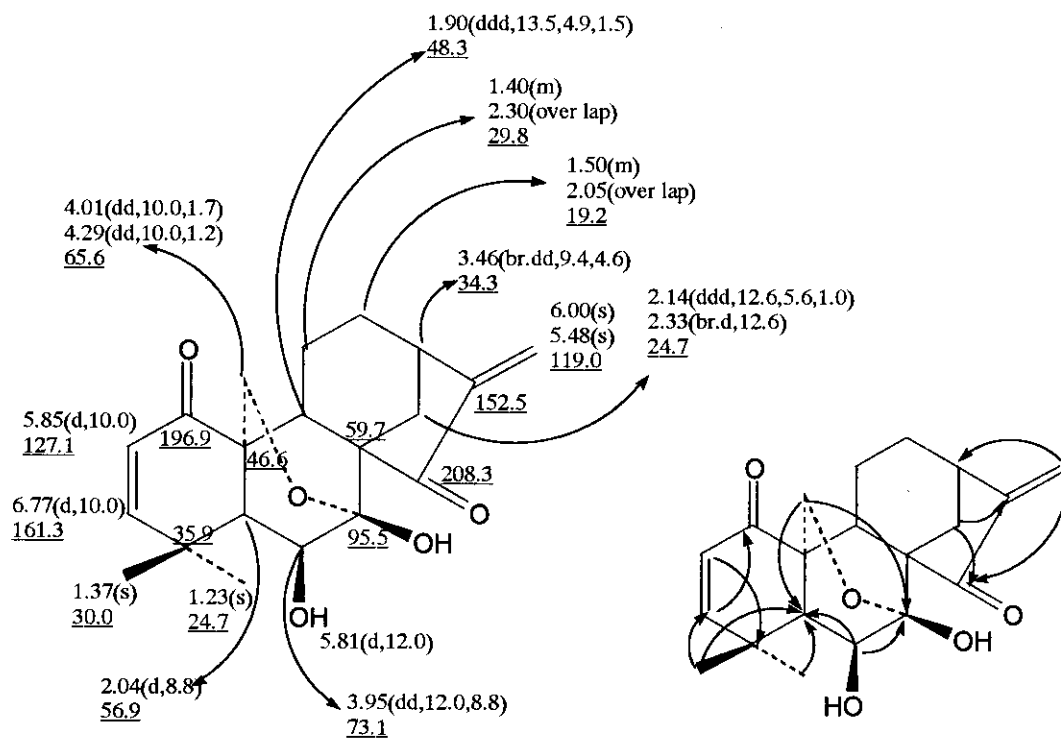
---- ACQUISITION PARAMETERS ----

Derived from: TNS-JI-1-C.1
File Name : TNS-JI-1-C.3
Author :
Sample ID : JI-1
Content : single_pulse decoupled
Creation Date : 10-FEB-2004 17:07:33

Revision Date : 10-FEB-2004 17:10:21
Spec Site : SCAS00

Spec Type : DELTA2_NMR
Data Format : 1D REAL
Dimensions : X
Dim Title : 13C
Dim Size : 52428
Dim Units : ppm
Exp Date :
Experiment : single_pulse_dec
Probe Id : 2492
Temp_get : 21.5 [dC]
Spin_get : 10 (Hz)
Solvent : CHLOROFORM-D
Recvr_gain : 74
Scans : 970.0
X_preproc : 4
Digital Filter : TR08
Filter Factor : 2
X_points : 65536
X_domain : 13C
X_offset : 100 (ppm)
X_freq : 125.75529768 (MHz)
X_sweep : 39.3081761 (kHz)
X_acq_time : 1.64723584 (s)
X_resolution : 0.55979517 (Hz)
Relaxation_delay : 2 (s)
Repetition_time : 3.86723584 (s)
X_angle : 30 (deg)
X_90_width : 10.3 (us)
X_pulse : 3.43333333 (us)
X_atn : 6.3 (dB)
Wdr_time : 2 (s)
Decoupling : TR08
Irr_domain : 1M
Irr_freq : 500.15991521 (MHz)
Irr_offset : 5.0 (ppm)
Irr_pwidth : 92 (us)
Irr_atn_noe : 21 (dB)
Irr_atn_dec : 21 (dB)
Irr_noise : WALTZ
Dead_time : 0 (us)
Delay : 0 (us)
Trf_pwidth : 1 (us)
Obs_pwidth : 1 (us)
Qui_pwidth : 1 (us)
Qua_pwidth : 1 (us)
Soc_pwidth : 1 (us)
Soc_pwidth : 1 (us)
Sep_pwidth : 1 (us)
Oct_pwidth : 1 (us)
Non_pwidth : 1 (us)
Dec_pwidth : 1 (us)

図 3. IJ-1 の ¹H-NMR および ¹³C-NMR



Selected HMBC spectrum of IJ-1

IJ-1 (rabdosiانونone I);
 FAB-MS; m/z 367 $[M+Na]^+$ $C_{20}H_{24}O_5Na$

図4. IJ-1 のNMRおよびMSデータ

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

サンダラック樹脂の成分・品質に関する研究

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;サンダラック樹脂の主成分を分離し、サンダラコピマール酸と決定した。またサンダラック樹脂中のその含有量を定量し、11.6%であることを明らかにした。

研究協力者 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

価値基準となる特徴的主成分を選択する。さらに
毒性実験を行うための基礎資料を提供する。

A. 研究目的

既存天然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、既存天然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天然添加物の一つでガムベースとして用いられているサンダラック樹脂について検討した。サンダラック樹脂はヒノキ科植物サンダラック (*Tetraclinis articulata* Mast.) の分泌する樹脂から製造され、主要成分としてジテルペンカルボン酸誘導体の存在が報告されている。そこで、我が国で流通しているサンダラック樹脂について天然添加物としての妥当性を検討することとし、今回提供を受けたサンダラック樹脂の特徴的な主成分を分離し構造決定するとともに、その定量法を検討し主成分の含有量を明らかにする。このことにより市場に流通しているサンダラック樹脂サンプルの品質評価を行うとともに、サンダラック樹脂の品質を維持するための評

B. 研究方法

提供されたサンダラック樹脂サンプルをメタノール (MeOH) に溶解し薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定性分析を行った。TLC には Merck TLC silica gel 60F₂₅₄ プレートおよび展開溶媒として CHCl₃・MeOH=70:1 を用いて行った。HPLC は逆相系カラム (Mightysil RP-18, Kanto Chemical)、溶媒として1%酢酸含有75% CH₃CN を用い、210 nm で検出して行った。その結果いくつかの化合物が存在することが確認され、TLC 上では分離の可能性が示唆されたのでシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂ c.c.) による分離を行った。

提供されたサンダラック樹脂は溶出する溶媒に不溶であったため、その50gをシリカゲルで倍散として SiO₂ c.c. を行った。溶出溶媒として CHCl₃ のみから出発し、MeOH を少しずつ加えて溶媒の極性を少しずつ上げながらクロマトグラフィーを行った。最終的に30余のフラクションに分け、これを TLC のパター

ンから7つのフラクションにまとめた。このうち比較的主成分が明確なフラクション2、3、4の一部を用いて、逆相系セミ分取カラム (Mightysil RP-18, 20x250 mm, Kanto Chemical co ltd.) および 75 % CH₃CN+1 % AcOH 溶媒系を用いた HPLC 分取および分取 TLC (PLC) (使用 TLC プレート; Merck, TLC silica gel 60 F₂₅₄, 200x200x0.5 mm) による分離を行った。分離の流れを図1に示す。得られた化合物については核磁気共鳴 (NMR) スペクトル, 質量スペクトル (MS) を測定し構造を決定した。また、本サンダラック樹脂中の主成分であったサンダラコピマール酸の含有量を HPLC を用いて測定した。HPLC の条件: カラム; Mightysil RP-18, 4.6x250 mm, Kanto Chemical, 溶媒; CH₃CN·H₂O·AcOH = 75:25:1, 検出; 210 nm.

C. 研究結果

サンダラック樹脂の TLC において比較的単純ではあるがテーリングした TLC パターンを示すとともに、HPLC においてもいくつかの分離ピークを示すが、その再現性に問題があった。これはサンダラック樹脂の主成分がジテルペンカルボン酸で酸性成分であることに起因すると考えられた。そこで、HPLC の溶離溶媒に酢酸を 1% 添加した CH₃CN·H₂O·AcOH = 75:25:1 を用いて分析することにより比較的良好的な分離が得られた。分取 HPLC において、サンダラック樹脂のカラムクロマトフラクションが溶媒に難溶性であり、できうる限り少量のサンプルを打ち込んでも数回繰り返すとカラムに詰まりが生じ、液送圧力高くなりポンプが停止するトラブルが生じ、HPLC による分

離は困難を極めた。一方、TLC においても、少量の分離では問題がなかったが、分取のために添加量を増すと、テーリングのためスポット間の重なりが生じ良好な分離は行えず、少量のサンプルしか扱えず、これも困難を極めた。そのため最小限度のサンプルを処理して SD-1 (6 mg)、SD-2 (45 mg)、SD-3 (9 mg)、SD-4 (22 mg) と仮称する成分を得た。TLC による分析では SD-1 および SD-4 には純度が問題であったため NMR 等の測定は行わなかった。SD-2 および SD-3 は比較的純度が高いと思われたので NMR の測定を行った。SD-3 は ¹H-NMR, ¹³C-NMR の結果ジテルペン誘導体であろうと推測されたが、矢張り純度が問題となり二次元 NMR の測定は行わなかった。SD-2 は純度にも問題がなく二次元 NMR の測定も行い構造解析を行った。SD-2 の ¹H-NMR, ¹³C-NMR データを図2に示す。

SD-2 は ¹H-NMR において3本のシングレットメチル基 [δ 0.83 (3H, s)、1.03 (3H, s)、1.20 (3H, s)]、ビニールグループ [δ 5.76 (1H, dd, J=17.3, 10.5 Hz)、4.87 (1H, dd, J=10.5, 1.5 Hz)、4.90 (1H, dd, J=17.3, 1.5)]、孤立した3置換オレフィングループ [δ 5.21 (1H, br.s)] および多くのメチレンシグナルが認められた。¹³C-NMR においては20本のピークが存在し、エキソメチレンを含む2つの二重結合 (δ 110.2, 129.2, 136.6, 148.9) およびカルボキシルグループ (δ 184.4) が認められそのほかの15本のシグナル、メチル、メチレン、メチン炭素であることが明らかになった。また、高速原子イオン化質量分析 (FAB-MS) において、*m/z* 303 に疑似親イオン [M+H]⁺ が認められ C₂₀H₃₁O₂ に相当し、分子式 C₂₀H₃₀O₂ に対応す

ることが明らかとなった。以上の結果から SD-2 がサンダラック樹脂の主成分と報告されているサンダラコピマール酸と推定された。二次元 NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC) データを詳細に検討した結果、SD-2 をサンダラコピマール酸と決定するとともに $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ データをアサインした。SD-2 の構造式、 $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ のアサイン及び HMBC 相関を図 3 に示す。

純度の高いサンダラコピマール酸を得ることができたので、これを用いて検量線を作成し本サンダラック樹脂中のサンダラコピマール酸含有量を定量した。その結果、その含有量は 11.6% であることが明らかになった。

TLC 分析におけるスポットの大きさ、HPLC 分析におけるピークの大きさからもサンダラコピマール酸が本サンダラック樹脂の主成分であることが明らかになった。その結果を図 4 に示す。

D. 考察

試験のために提供を受けたサンダラック樹脂は比較的有機溶媒に難溶性で、分離操作を行うために適当な濃度の溶液とすることが困難であった。これはその成分がジテルペンカルボン酸で結晶性が高いためと推察される。そのため、分取 HPLC, TLC 実行に際して容易に結晶が沈殿してくるため分離操作がしばしば不可能になった。そこで、希薄溶液の状態で分離操作を行わざるを得ず、大量のサンプルの処理ができなかった。その上、分離能も低くなり数的にも、純度の点でも、量的にも満足がいく分離を行えなかった。しかしながら、純度良く得られた SD-2 がサンダラックの主成分として

知られているサンダラコピマール酸であったことから、この成分のサンダラック樹脂中の含有量を TLC, HPLC で検討した結果 (図 3)、この化合物が主成分であることが明らかになった。さらに、この化合物を標準品としてその含有量を測定した結果、サンダラック樹脂中のサンダラコピマール酸の含有量が 11.6% であることが明らかとなった。以上の結果より、本サンダラック樹脂は天然素材から製造されたものと認めることができる。また、サンダラック樹脂の品質基準を規定するための基準物質としてサンダラコピマール酸が適当考えられる。

E. 結論

今回提供を受けたサンダラック樹脂からは最も多量に含まれる化合物としてサンダラコピマール酸を分離し、各種スペクトルデータから構造を確認した。そのほか含まれる化合物についても分離を行ったが、含有成分の溶媒に対する難溶性、高い結晶性が禍して良好な分離条件が得られず、純粋な化合物としてはサンダラコピマール酸以外は得られなかった。これは多くの含有成分がジテルペンカルボン酸誘導体で酸性物質であるためと推測される。

本試験材料の特徴的主成分であるサンダラコピマール酸の含有量を分析した結果 11.6% との結果が得られ、本化合物を品質評価の基準物質とするのが適当と考えられる。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

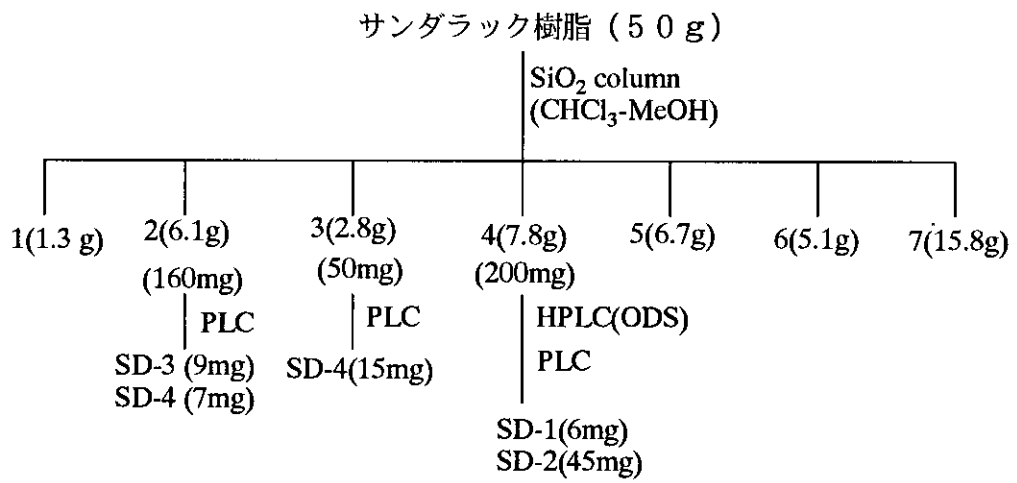


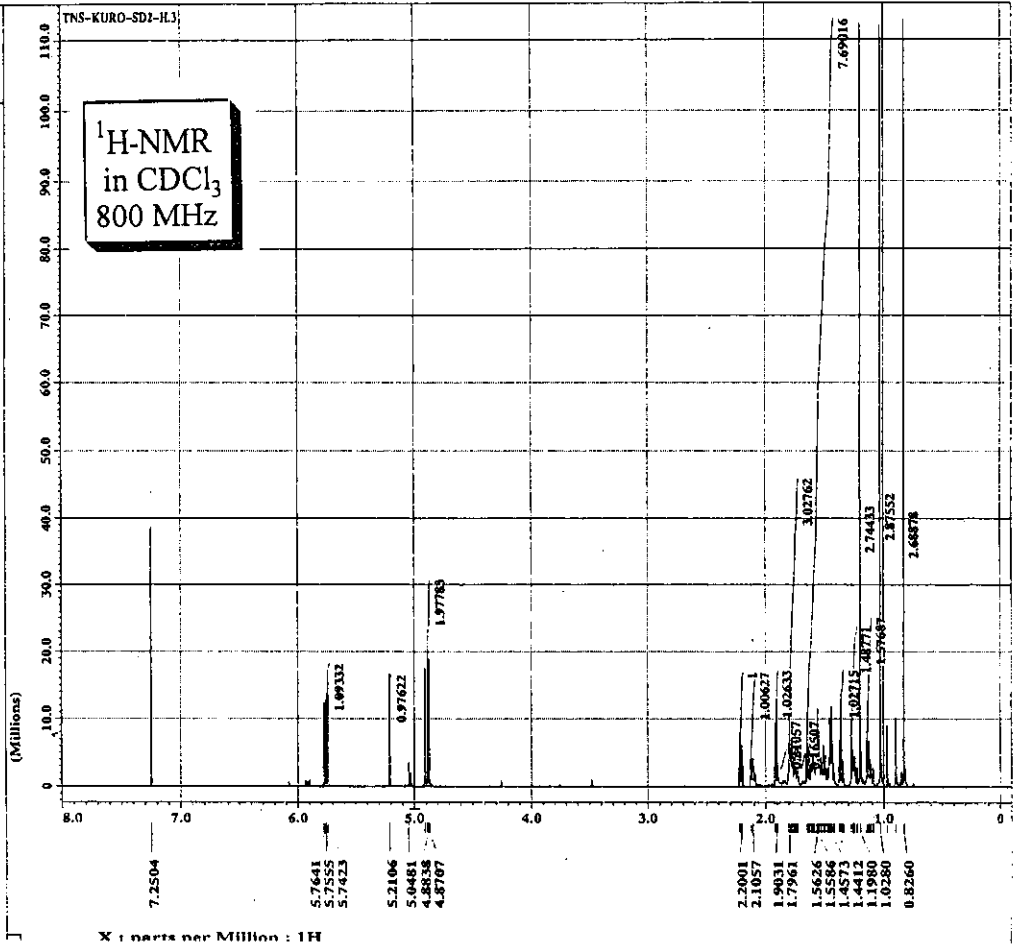
図1. サンダラック樹脂の分離

```

---- ACQUISITION PARAMETERS ----
Derived from: TMS-KURO-SD2-H.1
File Name      = TMS-KURO-SD2-H.1
Author         =
Sample ID      = SD2
Content        = single_pulse
Creation Date   = 31-MAR-2003 09:40:20

Revision Date  = 31-MAR-2003 09:43:47
Spec Site      = ECA900

Spec Type      = DELTA2_NMR
Data Format     = 1D_REAL
Dimensions     = X
  Title        = 1H
  In Size      = 26214
  Dim Units    = (ppm)
Experiment     = single_pulse.ex2
Probe Id       = J269
Temp Get       = 408.3 (dC)
Spin Get       = 12 (Hz)
Solvent        = CHLOROFORM-D
Recvr Gain     = 54
Scans          = 16
X_prescans     = 1
Digital Filter = TRUE
Filter Factor  = 4
X_points       = 32768
X_domain       = 1K
X_offset       = 5 (ppm)
X_freq         = 800.14000051 (MHz)
X_sweep        = 15.0060024 (kHz)
X_acq_time     = 2.18165952 (s)
X_resolution   = 0.45794685 (Hz)
Relaxation_delay = 5 (s)
Repetition_time = 7.18365952 (s)
X_angle        = 45 (deg)
X_90_width     = 7.5 (us)
X_pulse        = 3.75 (us)
X_ctc          = 2 (dB)
Dante preset   = PALSR
Irr_mode       = Off
Irr_domain     = 1K
Irr_freq       = 800.14000051 (MHz)
Irr_offset     = 5 (ppm)
Irr_pulsewidth = 57 (us)
Irr_mode       = Off
Irr_domain     = 1K
Irr_freq       = 800.14000051 (MHz)
Irr_offset     = 5 (ppm)
Irr_pulsewidth = 1 (us)
Obs_pulsewidth = 1 (us)
Qui_pulsewidth = 1 (us)
Qua_pulsewidth = 1 (us)
Sex_pulsewidth = 1 (us)
Sep_pulsewidth = 1 (us)
Oct_pulsewidth = 1 (us)
Non_pulsewidth = 1 (us)
Dec_pulsewidth = 1 (us)
  
```



```

---- ACQUISITION PARAMETERS ----
Derived from: TMS-KURO-SD2-C.1
File Name      = TMS-KURO-SD2-C.1
Author         =
Sample ID      = SD2
Content        = single_pulse_decoupled
Creation Date   = 1-APR-2003 13:48:55

Revision Date  = 1-APR-2003 13:48:55
Spec Site      = ECA900

Spec Type      = DELTA2_NMR
Data Format     = 1D_REAL
Dimensions     = 13C
  Title        = 13C
  In Size      = 52428
  Dim Units    = (ppm)
Experiment     = single_pulse_dec
Probe Id       = J268
Temp Get       = 408.1 (dC)
Spin Get       = 10 (Hz)
Solvent        = CHLOROFORM-D
Recvr Gain     = 70
Scans          = 33079
X_prescans     = 4
Digital Filter = TRUE
Filter Factor  = 2
X_points       = 65536
X_domain       = 13C
X_offset       = 100 (ppm)
X_freq         = 201.3514231 (MHz)
X_sweep        = 62.57229213 (kHz)
X_acq_time     = 1.04071168 (s)
X_resolution   = 0.96098092 (Hz)
Relaxation_delay = 12 (s)
Repetition_time = 3.04071168 (s)
X_angle        = 30 (deg)
X_90_width     = 14.5 (us)
X_pulse        = 5.5 (us)
X_ctc          = 2 (dB)
Ndc_time       = 2 (s)
Decoupling     = TRUE
Irr_domain     = 1H
Irr_freq       = 800.14000051 (MHz)
Irr_offset     = 5 (ppm)
Irr_pulsewidth = 57 (us)
Irr_mode       =
  -_ctc_dec     = 20 (dB)
  -_ctc_noise   = WALTZ
  Trl_pulsewidth = 1 (us)
  Obs_pulsewidth = 1 (us)
  Qui_pulsewidth = 1 (us)
  Qua_pulsewidth = 1 (us)
  Sex_pulsewidth = 1 (us)
  Sep_pulsewidth = 1 (us)
  Oct_pulsewidth = 1 (us)
  Non_pulsewidth = 1 (us)
  Dec_pulsewidth = 1 (us)
  
```

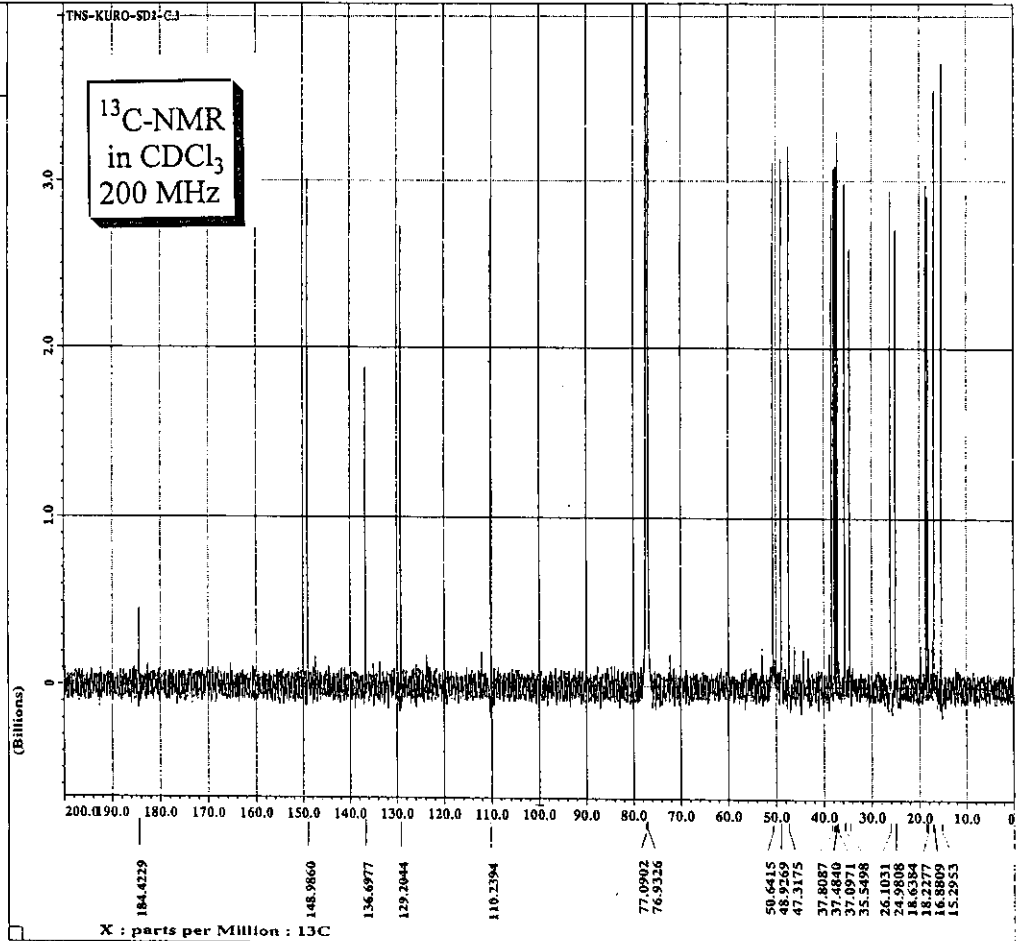
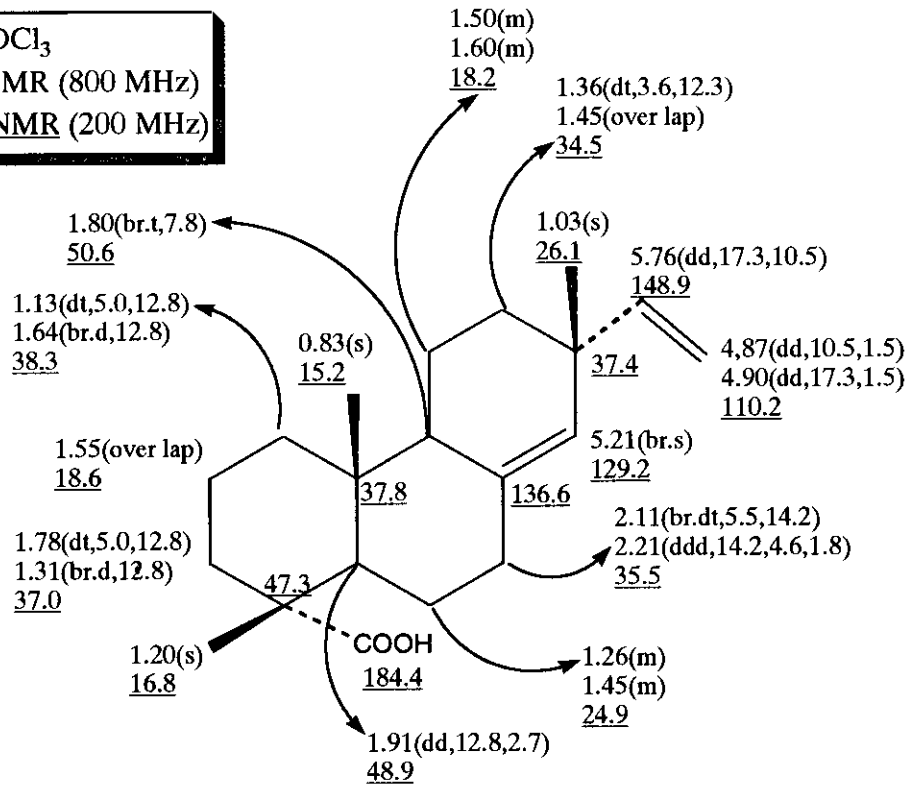
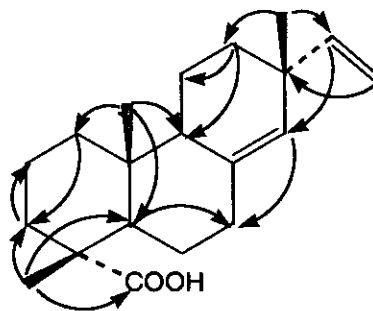


図 2. SD-2 の ¹H-NMR および ¹³C-NMR

in CDCl₃
¹H-NMR (800 MHz)
¹³C-NMR (200 MHz)

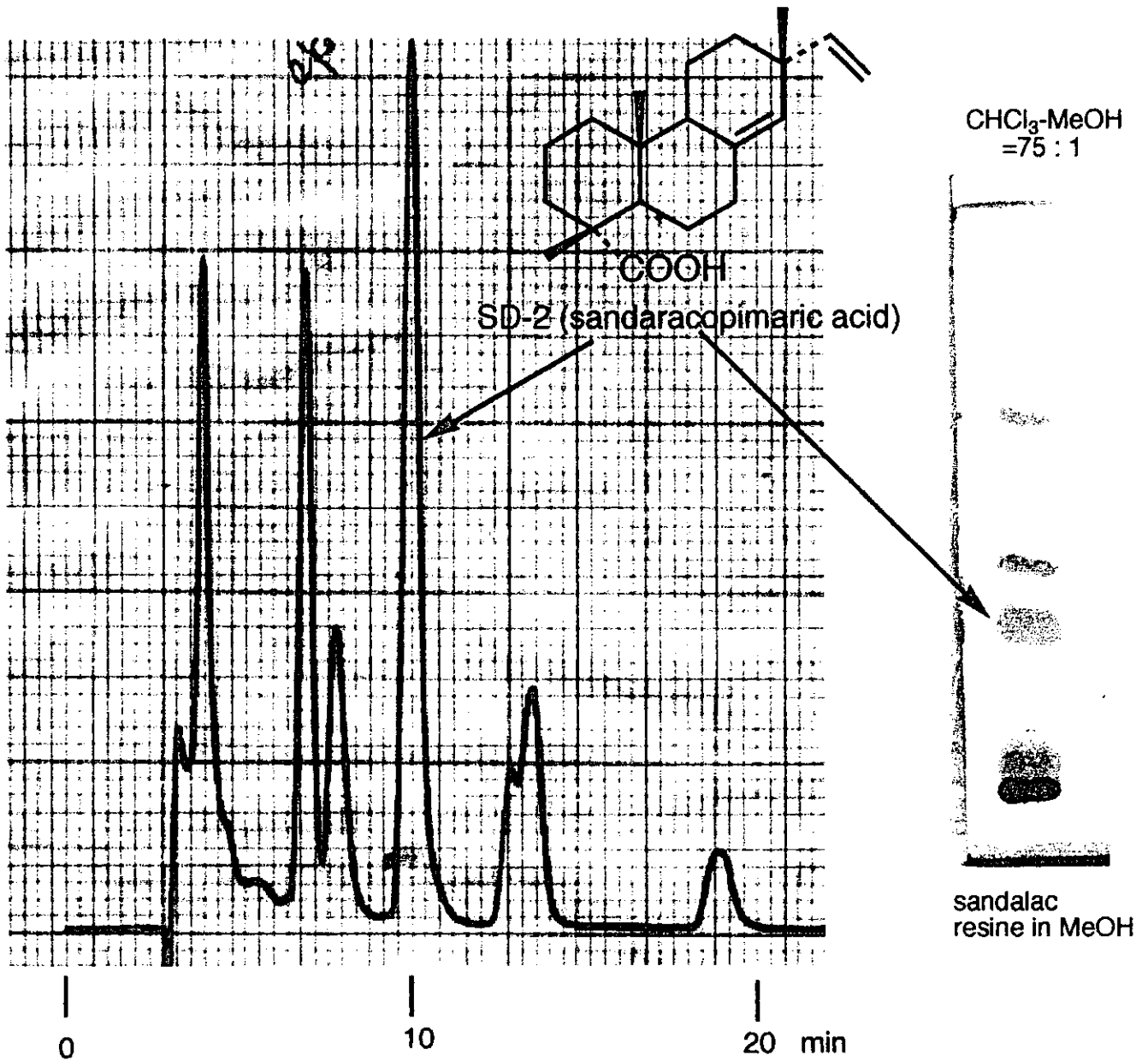


FAB-MS; m/z 303 [M+H]⁺ C₂₀H₃₁O₂



Selected HMBC of SD-2

図3. SD-2 の ¹H-NMR および ¹³C-NMR データ、FA-BMS と HMBC



column; ODS (mightysil, Kantho Chemical)
4.6 x 250 mm
sol; 90% CH₃CN + 1%AcOH, 1ml/min
detect; 210 nm

サンダラック樹脂中の主成分 sandaracopimaric acid 含量を
定量した結果、11.6% となった。

図4. サンダラック樹脂の HPLC および TLC パターン

分担研究報告書

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

「タデ抽出物」および「精油除去ウイキョウ」の成分探索

分担研究者 永津明人 名古屋市立大学 講師

研究要旨 「タデ抽出物」の探索の結果、12種の化合物を単離した。このうち3種は構造を同定しセスキテルペンの isodrimeninol と植物ステロールである β -sitosterol と stigmasterol であった。「精油除去ウイキョウ抽出物」は研究を開始したところであるが、シリカゲル TLC 上で全く展開されないものが大部分であり、分離の方針を検討している。

A. 研究目的

食品添加物「タデ抽出物」はヤナギタデの水又はエタノール抽出物で日持向上剤として使用されている。その主成分はポリゴジオールとされている。

また、食品添加物「精油除去ウイキョウ抽出物」は、ウイキョウを水蒸気蒸留した残渣から熱水抽出したものでシナビルアルコール配糖体を主成

分にすることになっている。しかしながら、両者とも規格品質を確認する上で主要成分以外の微量成分の解析が行われていない。以上のことから、その品質規格を作成する資料となりうるデータ収集を目的に、毒性試験に供されたものと同様の製法で得られた試料を用いて各食品添加物の成分探索を行った。

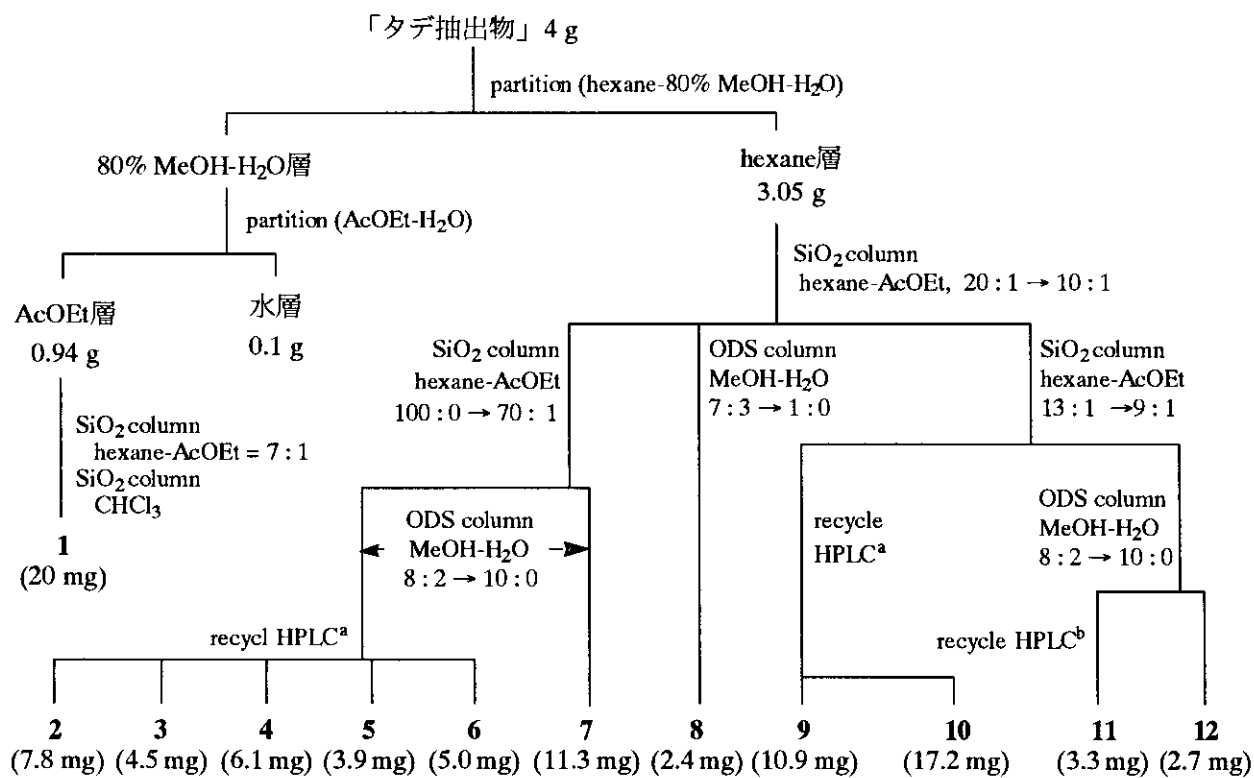


Fig. 1 「タデ抽出物」の分離

a カラム: YMC ODS-AQ Φ20 x 300 mm 溶媒: i-PrOH-H₂O = 90 : 10, 5 ml/min, 検出: UV 210 nm.

b カラム: YMC ODS-AQ Φ20 x 300 mm 溶媒: MeOH-H₂O = 80 : 20, 5 ml/min, 検出: UV 210 nm.

なお、「タデ抽出物」は平成11年に変異原性試験が、「精油除去ウイキョウ抽出物」は平成11年に90日間反復投与毒性試験が行われた。

タデ抽出物について：

B. 研究方法

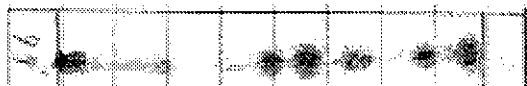
提供を受けた食品添加物「タデ抽出物」を原料に、Fig. 1 に示すように分離操作を行った。

まず、「タデ抽出物」は TLC 上で非常に多数のスポットを与えることから (Fig. 2)、まず、ヘキサンと80%メタノール-水で分配した後、80%メタノール-水により大きく分離した後をさらに AcOEt と水で分配、3画分を得た。水画分は全体の2.5%程しかなかった。比較的まとまったスポットのあった AcOEt 画分から分離にとりかかり化合物 **1** を得た。AcOEt 画分の TLC におけるその他の化合物のスポットは hexane 画分にも観察され、そちらの方が含有量が多かったことからこの化合物は hexane 画分の分画から得ることにした。シリカゲルカラムクロマトグラフィーでまず大きく分画、特徴的なスポットを与える画分をそれぞれ、シリカゲルカラム、ODS カラム、ODS の HPLC を用いて分離し、hexane 画分から 11 化合物を単離した。

展開溶媒 hexane:AcOEt = 10 : 1



展開溶媒 hexane:AcOEt = 3 : 1



展開溶媒 CHCl₃:MeOH = 10 : 1

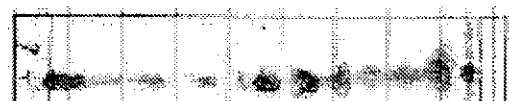


Fig. 2 「タデ抽出物」のシリカゲルTLC模式図
発色試薬：硫酸-バニリン試薬

C. 研究結果

まず化合物 **1** であるが、¹H-NMR スペクトルにおいて、シングレットのメチル基が3本、オレフィン

のプロトンが1H、酸素官能基に隣接していると推定できるプロトンが3Hが特徴的なシグナルとして観測された。¹³C-NMR スペクトルではメチル3個、メチレン5個、メチン4個、4級炭素3個の計15炭素が観測されセスキテルペンであることが推定できた。また、メチン1個は99.4 ppmに観測され、酸素官能基2個が結合していることが示唆された。2次元 NMR における H-C の相関から平面構造を決定し、**1** の平面構造を決定した。さらに相対立体配置は NOE 差スペクトルにおいて13位メチル基と11位メチンプロトンとの NOE が観測されたことから決定し、セスキテルペンの isodrimeninol と決定した。

(Fig. 3)

化合物 **9,10** は ¹H-NMR スペクトルを測定したところ、我々の研究室で以前単離しデータを持っている stigmasterol および β -sitosterol とそれぞれスペクトルが一致したことから、その構造を同定した。

その他の化合物 **2-8, 11, 12** はスペクトルの測定が終り、現在データ解析中である。

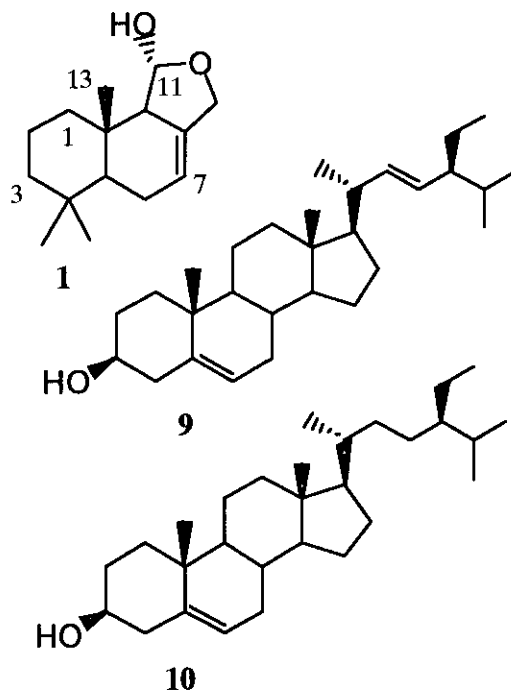


Fig. 3 「タデ抽出物」のからこれまでに単離構造決定した化合物

D. 考察

最初の分配操作において hexane に可溶なものが

全体の約75%、AcOEtに可溶な部分を含めると全体の97.5%という結果から、提供を受けたサンプルは少なくともタデの水抽出物ではなさそうである。企画書から推察するとエタノールエキスでなければならないが、それにしてもhexane可溶部が多く、水画分が少なすぎる。Hexane、CHCl₃等の非極性溶媒で抽出されてきた抽出物である可能性が高いと考えられる。サンプルとなっている「タデ抽出物」の製造方法の確認が必要である。

精油除去ウイキョウについて：

B. 研究方法

提供を受けた食品添加物「精油除去ウイキョウ抽出物」(デキストリン添加)の分離方針を決定するため、まず種々の展開溶媒と発色試薬でTLC上スポットの確認を行った。

C. 研究結果 および D. 考察

得られたTLCの模式図をFig. 4に示す。どのような溶媒でも全く展開されない部分が大部分で、極めて極性の大きいものが含まれている、又は分子量の大きいものが含まれていることが示唆された。展開されたUV吸収のあるスポットは、硫酸-バニリン試薬で発色しないことから、主成分とされているシナビルアルコールの配糖体ではないと考えられる。

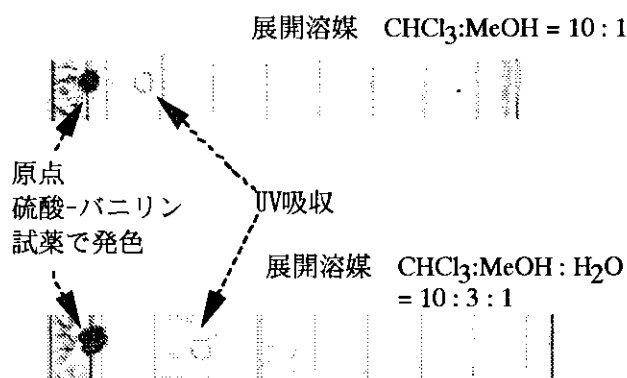


Fig. 4 「精油除去ウイキョウ抽出物」のシリカゲルTLC模式図

E. 結論

「タデ抽出物」に関しては、分離の結果12化合物を単離し、そのうち3種は isodrimeninol、 β -sitosterol と stigmasterol であった。また、非極性の画分の割合が多く提供を受けたものが、実際に市場に出回っているものかどうか疑問の余地があると考えられた。

「精油除去ウイキョウ抽出物」に関しては緒についた所ではあるが、TLC上展開されないものが多く、極めて極性の大きいものが含まれていることが推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし