

Table 1 Compositions of Wax Esters and Fatty Acid Moiety in Jojoba Wax

Peak *1 Number	Chain length: unsaturation	Composition*2 at UV 204 nm (%)	Fatty acid moiety		Fatty alcohol moiety	
			Chain length	% *3	Chain length	% *4
Jojoba wax (whole)			16:0	1.6	16:0	1.6
			18:1	16.1	18:1	16.1
			20:1	73.9	20:1	73.9
			22:1	7.4	22:1	7.4
			24:1	1.1	24:1	1.1
1	36:2	1.1	— *5	—	—	—
2	38:2	7.2	16:0	9.6	22:1	1.8
			18:1	76.0	20:1	91.4
			20:1	14.4	18:1	6.8
3	40:2	27.3	18:1	7.8	22:1	11.3
			20:1	92.2	20:1	88.7
4	42:2	48.0	20:1	77.7	22:1	80.1
			22:1	22.3	20:1	18.3
5	44:2	9.5	20:1	70.0	24:1	64.8
			22:1	20.4	22:1	24.0
			24:1	9.7	20:1	9.5
6	46:2	1.3	—	—	—	—

\*1 Peak number shown in Fig. 1A.

\*2 Composition of peak areas at UV 204 nm by HPLC analysis shown in Fig. 1A.  
The values mean the relative peak area percentages against the total peak area.

\*3 Composition of peak areas of fatty acid methyl esters on total ion chromatograms by GC/MS analysis

\*4 Composition of peak areas of trimethylsilylated alcohols on total ion chromatograms by GC/MS analysis

\*5 not determined

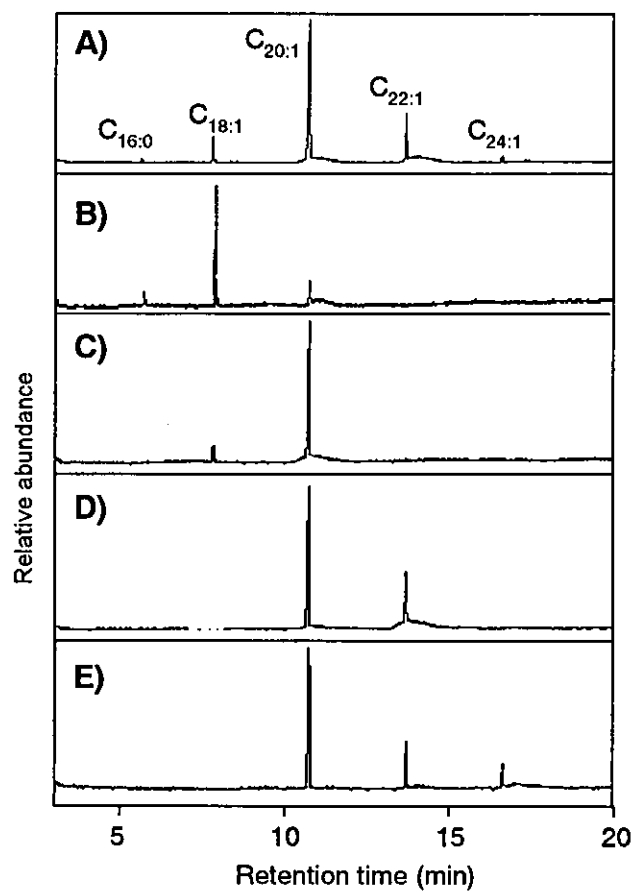


Fig. 3 GC/MS analysis of fatty acid methyl esters obtained by methanolysis of jojoba wax(A), peak fractions 2-5 (B to E) isolated by preparative LC/MS. The chromatograms show the total ion monitoring in EI mode.

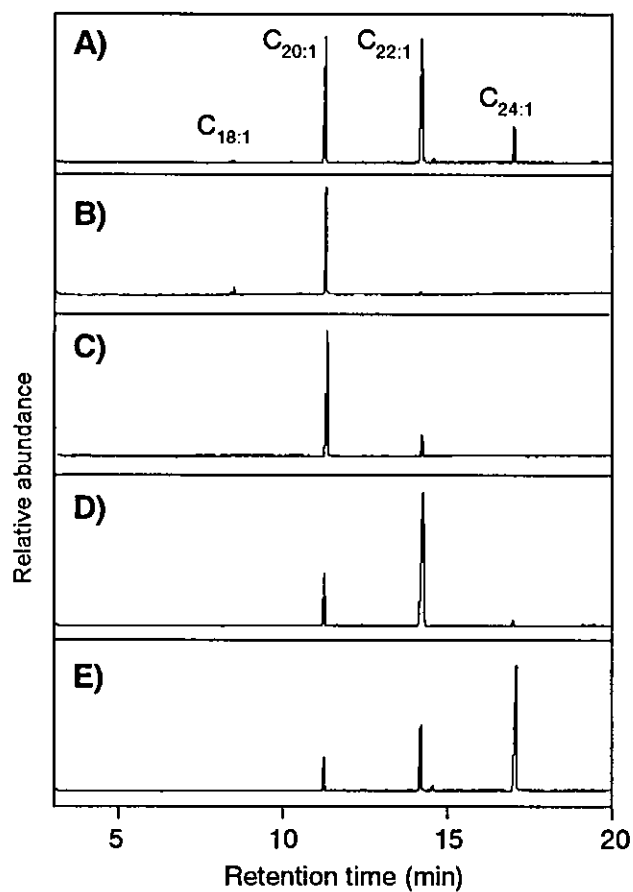


Fig. 4 GC/MS analysis of trimethylsilylated alcohols obtained by hydrolysis and trimethylsilylation of jojoba wax(A), peak fractions 2-5 (B to E) isolated by preparative LC/MS. The chromatograms show the total ion monitoring in EI mode.

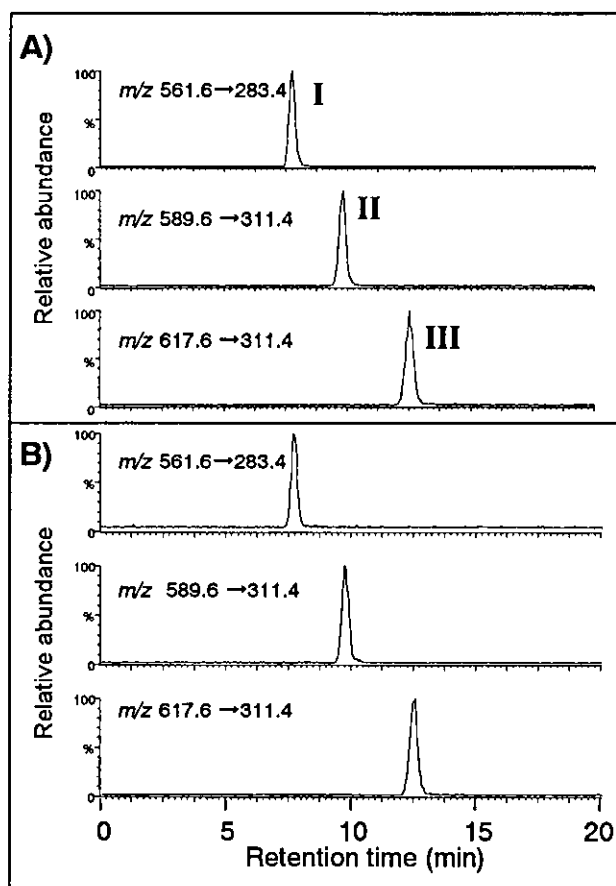


Fig. 5 Detection of product ions of the synthesized wax esters I-III (A) and the wax esters in jojoba wax (B) by LC/MS/MS analysis using APCI positive mode scanning.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
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

平成 16 年度協力研究報告書  
天然苦味料レイシ抽出物中の苦味成分の分析

研究協力者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

**研究要旨** 天然苦味料レイシ抽出物製品の苦味成分について LC/MS により分析した結果、ganoderic acid 類を主苦味成分とするラノスタン型トリテルペノイドの複雑な混合物であることがわかった。

### A. 研究目的

天然苦味料レイシ抽出物（英名：Mannentake extract）は、既存添加物名簿収載品目リストに収載される天然添加物の苦味料の 1 つである。その基原・製法・本質として、「サルノコシカケ目マンネンタケ (*Ganoderma lucidum* KARST.) の子実体、菌糸体または培養液より、水、エタノールまたは二酸化炭素で抽出して得られたものである。」と記載されているが、本抽出物中の主成分や有効成分は記載されていない。

レイシ(霊芝)は、我が国ではマンネンタケ(万年茸)と称される茸の子実体で、古来不老長寿の妙薬とされ、「神農本草経」の上品の中に収載されている薬物で、高脂血症、狭心症、肝炎、腎炎、消化性潰瘍、糖尿病など多様な疾病に有効とされてきた。

マンネンタケ (*Ganoderma lucidum* KARST.) は、担子菌類 (Basidiomycetes) サルノコシカケ科 (Polyporaceae) マンネンタケ属 (*Ganoderma*) に属する 1 年生キノコで、形態は、子実体外層は堅い皮殻に被われ、初めは黄白色から黄褐色、後に赤褐色になる。表面は強い光沢があり傘下面(菌褶部)は黄白色を呈し、噛めば苦味を示す。我が国では、1975 年以降、マンネンタケの人工栽培の成功により大量供給が可能となり、その熱水エキスが体質改善、諸病の予防や治療に役立つ健康食品として多種多様な形態で市販されている。また、古くから癌などの難病に効くとされてきた。

したがって、生薬としても各種の効能が期待されることから、食品添加物としてよりもむしろ健康食品素材として多く流通しており、本抽出物の含量が非常に高い加工食品が流通している推定される。

以上の理由から、本抽出物の化学的な安全性の確認のために、レイシ抽出物製品中の苦味成分および微量成分について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 試料及び試薬

天然苦味料レイシ抽出物 1 社 1 製品は、(財)日本食品添加物協会を通じて入手したものをを用いた。Ganoderic acid A, B, C1, C2, G, H は、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の保存サンプルを用いた。その他の試薬は特級品を用いた。

#### 2. LC/MS による苦味成分の分析

苦味成分試料の調製は、マンネンタケ(霊芝)加工食品規格基準(昭和 63 年 5 月 10 日公示、平成 5 年 7 月 1 日一部改正)の方法を参考に行った。レイシ抽出物製品 5.0 g をとり、H<sub>2</sub>O 50 ml を加え、5 分間振り混ぜた後、EtOH 50 ml を加えて、よく振り混ぜた後、遠心(3000 rpm, 3 min)後、ろ過した。残留物を希 EtOH (EtOH:H<sub>2</sub>O=1:1) 100 ml で同様に操作した。ろ液を合わせ減圧下に濃縮し、全量を

10 ml 以下にした。濃縮物を H<sub>2</sub>O 100 ml に分散させ、CHCl<sub>3</sub> 25 ml で 3 回抽出した。CHCl<sub>3</sub> 層を合わせ、5% NaHCO<sub>3</sub> 試液 50 ml で 3 回抽出した。水層を合わせ 2 mol/L HCl 試液にて pH 3 に調整し、クロロホルム 100 ml で 3 回抽出した。CHCl<sub>3</sub> 層を合わせ減圧下で CHCl<sub>3</sub> を留去し、苦味成分 344 mg を得た。苦味成分 8.0 mg を 800 μL CH<sub>3</sub>CN に溶解したものを LC/MS 用試験溶液とし、下記の条件の LC/MS に付した。LC/MS system (LC: Alliance 2695; PDA: 2996 photodiode array detector; MS: ZQ2000 (Waters 社製))。LC 条件: カラム, TSK gel ODS80TsQA (2.1 mm i.d. × 250 mm, (東ソー)); カラム温度, 40°C; 移動相, 2% 酢酸 : CH<sub>3</sub>CN = 72 : 28; 注入量, 2.0 μL; 流速, 0.15 mL/min; PDA, 192-600 nm; 検出波長, 254 nm。MS 条件: ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 350°C; 脱溶媒ガス, 350 L/h; コーンガス, 60 L/h, キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, ±30 V (ESI pos. and neg.); スキャン範囲, *m/z* 50-1000。

### C. 研究結果および考察

マンネンタケ(霊芝)の苦味成分に関しては、久保田ら(*Helv. Chim. Acta*, **65**, 611 (1982))により初めて ganoderic acid A, B と命名された 2 種の化合物が単離された。続いて Toth ら(*Tetrahedron Lett*, **24**, 1081 (1983), *J. Chem. Res.*, (S), 299 (1983), 2722 (1983))により ganoderic acid U, V, W, X, Y, Z が、坂村ら(*Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2905 (1984))により、ganoderic acid A と類似構造を持つ ganoderic acid C1 の他、側鎖が酸化開裂された特異な構造を持つ lucidenic acid A, B, C が報告されている。また、山崎ら(*Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1367 (1985))により、ganoderic acid C1, C2 が、更に、池川ら(*Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3025 (1986))により、ganoderol A, B, ganoderic acid K, S1 が報告されている。最近では、村井ら(*FFI Journal*, **179**, 29 (1999))および服部ら(*Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 688 (2004))などにより、新規化合物が続々と報告され

ており、現在までに合計 80 種以上が単離・同定されている。

天然苦味料レイシ抽出物の苦味成分を分析するために、文献調査を行った結果、レイシ(マンネンタケ)中の苦味成分と考えられる化合物 86 種を Table 1 にまとめた。化合物名は、各研究グループによってそれぞれほぼ同時期に個別に命名されたために、混乱が見られ、現在までに数回の訂正が行われており、各化合物名は完全に統一されているとは言い難い。よって、本研究におけるすべての化合物名は混乱を避けるため、難波恒雄の著書「和漢薬百科図鑑(II)」に記載された化合物名に従い、これに収載されていない化合物については最新の論文に記載の化合物名を用いた。

Fig. 1 にレイシ抽出物より抽出した苦味成分を LC/MS に付した結果を示した。LC 条件を検討したが、ピーク分離は主に分析時間に依存し、短時間(30 min)の分析条件では各ピークを分離することは困難であった。今回、長時間(150 min)の分析条件を用いることで漸くピークを分離することが出来たが、更に分析時間を長くするといくつかのピークは更に分離した。この結果は、レイシ抽出物の苦味成分が非常に多くの化合物の混合物であり、更に、各化合物の構造が類似していることが原因と考えられた。LC 条件を検討した結果、それぞれ単一の化合物に由来すると考えられたピーク A-R の極大吸収、観察された ESI-MS (pos. and neg.) と推定分子量、また、推定分子量より推定される化合物を Table 2 に示した。

Ganoderic acid A, B, C1, C2, G, H の標品を用い、ピークの同定を行った。その結果、ピーク B が ganoderic acid C2 (60)、ピーク F が ganoderic acid G (68)、ピーク H が ganoderic acid B (53)、ピーク K が ganoderic acid H (78)、ピーク N が ganoderic acid A (52)、ピーク R が ganoderic acid C1 (45) と同定した (Fig. 2)。レイシ抽出物の苦味成分は主に 3, 7, 11, 12, 15 位等に多数の酸素官能基を含むラノスタン型トリテルペノイドであり、また、酸素官能基の

位置が異なるだけで分子量が等しいものが多い。また、各化合物の UV 吸収は主に 8, 9, 11 位の  $\alpha$ ,  $\beta$  不飽和ケトンによるもので、スペクトルも殆ど同じ形状を示す。よって、他のピークについては、分子量関連イオンの検出により、各ピークに由来する化合物を推定することは出来たが、同一の分子量を持つ化合物が多く存在することから、それぞれを同定するに至らなかった。

したがって、今回の研究の結果、レイシ抽出物の苦味成分は、ラノスタン型トリテルペノイドの ganoderic acid 類を主苦味成分とすることが確認されたが、複雑な混合物であるため、個々の成分を同定するには単離した後に NMR 等により構造決

定する必要があった。

#### D. 結論

1. レイシ抽出物製品の苦味成分は、ganoderic acid 類を主苦味成分とするラノスタン型トリテルペノイドの複雑な混合物であることがわかった。
2. 既存添加物名簿収載品目リストのレイシ抽出物の基原・製法・本質の項には、苦味成分についての記載はない。今回の結果から、レイシ抽出物の苦味成分について記載する場合には、「苦味成分は、ganoderic acid 類を主成分とするラノスタン型トリテルペノイド類である」と記載できると考えられた。

Table 1 Reported constituents in *Ganoderma lucidum* KARST.

No. Name	Formula	MW	No. Name	Formula	MW	No. Name	Formula	MW
1 lucidone B	C24H32O5	400	30 methyl Lucidenate Q	C28H42O6	474	59 compound B9	C30H46O7	518
2 lucidone A	C24H34O5	402	31 lucidenic acid C	C27H40O7	476	60 ganoderic acid C2	C30H46O7	518
3 lucidone C	C24H36O5	404	32 lucidenic acid G	C27H40O7	476	61 lucidenic acid P	C29H42O8	518
4 lucialdehyde A	C30H46O2	438	33 tetra oxo compound	C30H42O6	498	62 ganoderic acid V	C32H48O6	528
5 ganoderal A	C30H44O3	452	34 ganoderic acid	C30H44O6	500	63 ganoderic acid X	C33H52O5	528
6 ganoderic acid S1	C30H44O3	452	35 ganolucidic acid A	C30H44O6	500	64 compound C6	C30H42O8	530
7 lucialdehyde B	C30H44O3	452	36 ganolucidic acid D	C30H44O6	500	65 ganoderic acid D	C30H42O8	530
8 ganoderic acid Y	C30H46O3	454	37 ganoderic acid Mj	C31H50O5	502	66 ganoderic acid Ma	C32H50O6	530
9 ganoderiol F	C30H46O3	454	38 ganolucidic acid B	C30H46O6	502	67 ganoderic acid	C30H42O8	530
10 ganoderol A	C30H46O3	454	39 ganoderenic acid D	C30H40O7	512	68 ganoderic acid G	C30H44O8	532
11 lucialdehyde C	C30H46O3	454	40 ganoderic acid E	C30H40O7	512	69 ganoderic acid I	C30H44O8	532
12 ganoderic acid Z	C30H48O3	456	41 ganoderic acid Mf	C32H48O5	512	70 ganoderic acid	C30H44O8	532
13 ganodermanondiol	C30H48O3	456	42 ganoderic acid S	C32H48O5	512	71 methyl Lucidenate P	C30H44O8	532
14 ganodermatriol	C30H48O3	456	43 ganoderenic acid A	C30H42O7	514	72 ganoderic acid L	C30H46O8	534
15 ganoderol B	C30H48O3	456	44 ganoderenic acid B	C30H42O7	514	73 ganoderic acid Mi	C33H52O6	544
16 lucidenic acid F	C27H36O6	456	45 ganoderic acid C (C1)	C30H42O7	514	74 ganoderic acid Me	C34H50O6	554
17 lucidumol A	C30H48O3	456	46 ganoderic acid J	C30H42O7	514	75 ganoderic acid R	C34H50O6	554
18 lucidenic acid A	C27H38O6	458	47 ganoderic acid V1	C30H42O7	514	76 ganoderic acid F	C32H42O9	570
19 lucidumol B	C30H50O3	458	48 ganoderic acid	C30H42O7	514	77 ganoderic acid Mk	C34H50O7	570
20 ganoderic acid S	C30H46O4	470	49 lucidenic acid D (D2)	C29H38O8	514	78 ganoderic acid H	C32H44O9	572
21 ganoderiol B	C30H46O4	470	50 compound B8	C30H44O7	516	79 ganoderic acid W	C34H52O7	572
22 lucidenic acid D1	C27H24O7	470	51 ganoderenic acid C	C30H44O7	516	80 ganoderic acid	C32H46O9	574
23 ganoderic acid U	C30H48O4	472	52 ganoderic acid A	C30H44O7	516	81 ganoderic acid Md	C35H54O7	586
24 ganodermanontriol	C30H48O4	472	53 ganoderic acid B	C30H44O7	516	82 ganoderic acid Mh	C34H52O8	588
25 ganodermantriol	C30H48O4	472	54 ganoderic acid K	C30H44O7	516	83 ganoderic acid Mg	C35H54O8	602
26 lucidumol A	C30H48O4	472	55 ganoderic acid	C30H44O7	516	84 ganoderic acid T	C36H52O8	612
27 ganoderiol A	C20H50O4	474	56 ganoderic acid	C30H44O7	516	85 ganoderic acid Mb	C36H54O9	630
28 lucidenic acid B	C27H38O7	474	57 ganoderic acid	C30H44O7	516	86 ganoderic acid Mc	C36H54O9	630
29 lucidenic acid E1	C27H38O7	474	58 lucidenic acid E (E2)	C29H40O8	516			



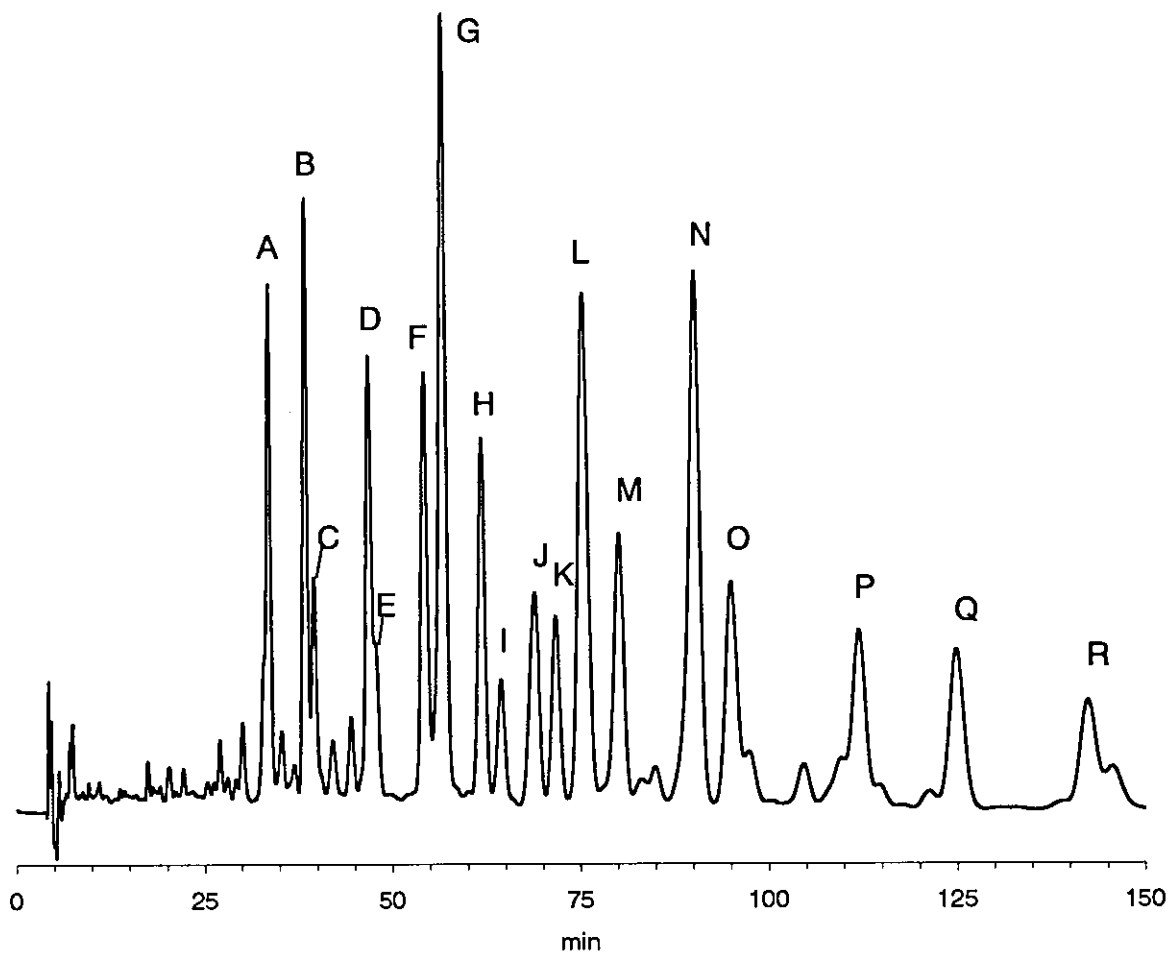
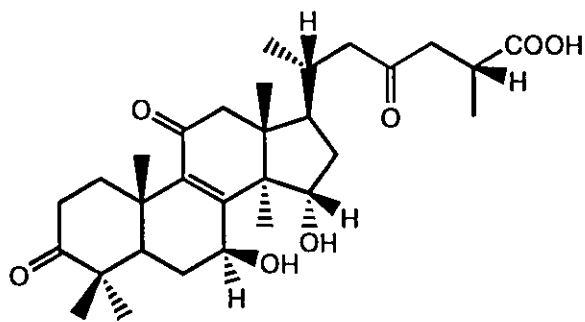


Fig. 1 LC profile of bitter constituents in mannentake extract

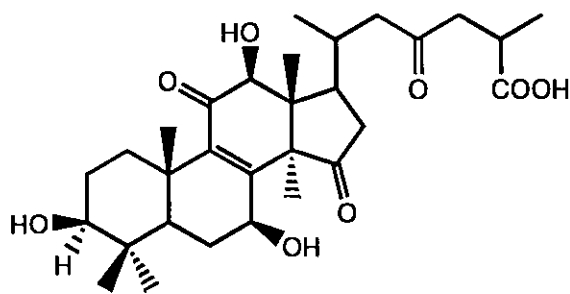
Table 2 ESI-MS and UV max of observed peaks A-R

peak	UV max	observed ESI-MS						estimated molecular weight	estimated compound
		positive ion			negative ion				
A	252	517	499	481	463	515	516	50-58	
B	258	519	501	483	465	517	518	59-61	
C	257	477	459	441		475 457	476	31-32	
D	258	461	443	425		459	460		
E	259	531				529 511	530	64-67	
F	257	533	515			531 513	532 514	68-71, 43-49	
G	248	515	497			513 495	514 496	43-49	
H	258	517	499	481		515 497	516 498	50-58, 33	
I	248	513				511	512	39-42	
J	266	517				515	516	50-58	
K	250	573	555	513		571 553	572	78-79	
L	253	557	515	497	479	555 513	556 514	43-49	
M	257	461	443	425	407	459 473	460	27-30	
N	257	517	499	481	463	515	516	50-58	
O	263	573				571 553	572	78-79	
P	258	459	441	423	405	457	458	18-19	
Q	248	513	495	477		511 493	512	39-42	
R	256	515	497	479	457	513 495	514 496	43-49	



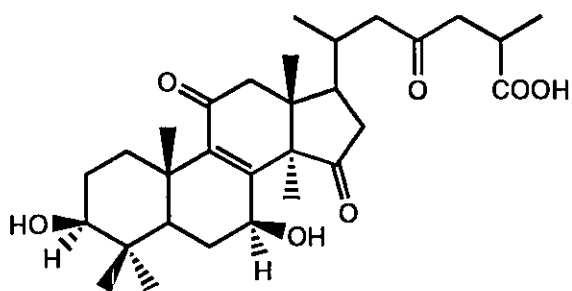
ganoderic acid A (52)

$C_{30}H_{44}O_7$   
MW: 516



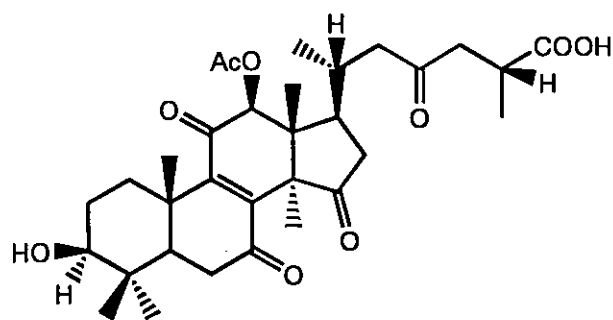
ganoderic acid G (68)

$C_{30}H_{44}O_8$   
MW: 532



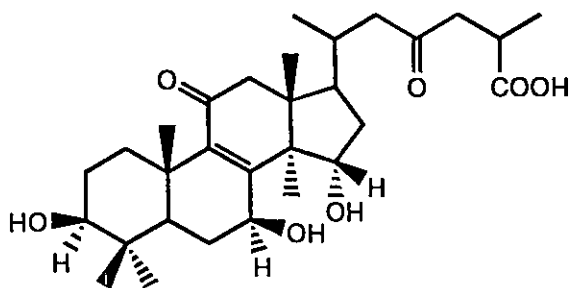
ganoderic acid B (53)

$C_{30}H_{44}O_7$   
MW: 516



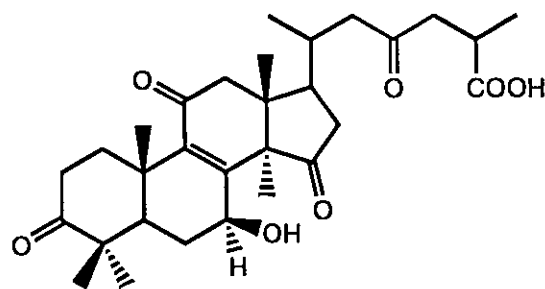
ganoderic acid H (78)

$C_{32}H_{44}O_9$   
MW: 572



ganoderic acid C2 (60)

$C_{30}H_{46}O_7$   
MW: 518



ganoderic acid C1 (45)

$C_{30}H_{42}O_7$   
MW: 514

Fig. 2 Structures of ganoderic acids

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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

平成 16 年度協力研究報告書

チャ種子サポニンの成分に関する研究

研究協力者 黒柳 正典 広島県立大学生物資源学部 教授  
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 本年度の担当品目であるチャ種子サポニンについてその成分検索を行った。その結果、フラボン配糖体 2 種類とサポニンが含まれると考えられるフラクションを分離した。フラボン配糖体の一つはチャ種子成分として知られている camelliaside B であることが判明した。

A. 研究目的

既存保存剤等の化学成分を明らかにし、その品質と安全性に対する問題の有無を明らかにする。その一環として、チャ種子サポニンの成分検討を行った。

B. 研究方法

チャ種子サポニンはツバキ科チャ (*Camellia sinensis* O. Kze.) の種子を脱脂後エタノール抽出して得られたサポニンを主成分とするものである。乳化剤として用いられている。

粉末状の本品はメタノールに比較的可溶であったため、そのままメタノールに溶解して以下のように成分分析を行った。

チャ種子サポニン (Lot. 030730) 600 mg をメタノールに溶解し不要物を濾過して除いた後、約 1 ml に濃縮し、これを分取 TLC (PLC) 用 TLC 板 (Merck, silica gel 60 F<sub>254</sub>, 200 x 200 x 0.5 mm) 15 枚にスポットし、風乾後展開溶媒として、CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 17 : 10 : 1 の溶媒を用いて展開した。展開完了後風乾し、254 nm の UV を照射して UV 吸収を示すフラボンと思われる 2 つのスポットと部分 (Rf

0.3 付近および Rf 0.2 付近) および硫酸噴霧・加熱で褐紫色に発色するサポニン含有部分部分 (Rf 0.13 から原点付近) が主要成分として確認され、他にもいくつかのスポットが認められたが、量的にかなり少なかった。そこで、これらの主要な 3 つの部分の薄層板上から掻き取って、それぞれの掻き取ったシリカゲルから CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 4 : 1 の溶媒を用いて吸着成分を抽出し、2 つのフラボン対応部分、TSEM-1 (28 mg), TSEM-2 (30 mg) およびサポニン含有部分 TSEM-3 (300 mg) を得た。TSEM-1 および TSEM-2 についてはさらに同様の分取 TLC を行うことにより精製を行った。TSEM-1 から TSE-1 (18 mg), TSEM-2 から TSE-2 (19 mg) を得た。これら 2 つの化合物は HPLC (ODS カラム、Mightysil RP-18, 4.6x 250 mm, 関東化学、20 % CH<sub>3</sub>CN 1mL/min) によりそれぞれ単一ピークを示し、TSE-1 のリテンションタイム (8 分) は TSE-2 のリテンションタイム (6.1 分) より長かった。TLC 上ではそれぞれワンスポットを示し、硫酸噴霧・加熱で黄色に発色することからフラボン誘導体の可能性が示された。TLC 上のスポット

も移動距離は TSE-1 の方が TSE-2 の移動距離が長かった。このことから TSE-1 よりも TSE-2 の方が極性の高いことが判る。

サポニン含有フラクションは TLC 上で数種類のサポニンの混合物であることが予想されたのでさらに分離精製を行うところである。

分離の流れを図 1 に示す。

分離した TSE-1 および TSE-2 については核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを測定して構造の検討を行った。

### C. 研究結果

フラボンと思われるフラクションは HPLC による分離精製を行い 2 つの物質、TSE-1 (18 mg), TSE-2 (19 mg) を得た。サポニン含有フラクション TSEM-3 (300 mg) には複数のサポニンが混在することが予想された。

分離した TSE-1, TSE-2 は TLC 上で硫酸噴霧・加熱により黄色に発色することからもフラボン誘導体であることが推定された。

2次元 NMR を含む NMR データを中心とするスペクトルデータの詳細な検討を行った。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルに於いて TSE-1 はそれぞれ 2H 分のオルトカップリングしたプロトンの存在することから B-環が対象構造を持っていることが判り、それぞれ 1H 分のお互いにメタカップリングプロトンが認められることから A-環の 5,7-位に水酸基が存在することが判る。以上のことから TSE-1 は kaempferol の配糖体であることが明らかになった。糖としては、<sup>13</sup>C-NMR データから glucose, rhamnose, xylose の存在が推定され、2次元 NMR の詳細な検討の結果、kaempferol の 3 位に glucose, が結合し、さらに glucose の 2 位に xylose, 6 位に rhamnose の結合した camelliaside B と推定された。2次元 NMR

の HMBC 実験データで、相関が不十分な部分があり、確実な構造は決定できていないが、おおむね間違いないものと考えられる。TSE-2 は TSE-1 と類似した NMR シグナルパターンを有しているが、糖鎖関連領域のピークの数が多くしかもやや複雑であること、先に述べたように極性が TSE-2 は TSE-1 よりやや高いこと等から、TSE-2 は TSE-1 にさらに糖が一つ結合したものと考えられる。TSE-1 及び TSE-2 の予想される構造を図 2 に示す。

サポニン含有フラクションについては分離条件の検討を行っているところである。

### D. 考察

今回試験を行ったチャ種子サポニン中の主成分として、フラボン配糖体である camelliaside B およびさらに糖の結合したフラボン誘導体が主成分として存在することが明らかになった。本品がチャ種子サポニンと呼ばれており、確かにサポニンは主成分ではあるが、フラボン配糖体も主成分の一つとと考えることが出来る。

### E. 結論

今回検討したチャ種子サポニンはチャ種子から分離され報告されている camelliaside B が主成分の一つとして分離され、サポニンを主に含有する主要フラクションが得られていることから、本品がチャ種子を材料として製造された物であることを示している。

### F. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

G. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得  
無し
- 2. 実用新案登録  
無し

3. その他

無し

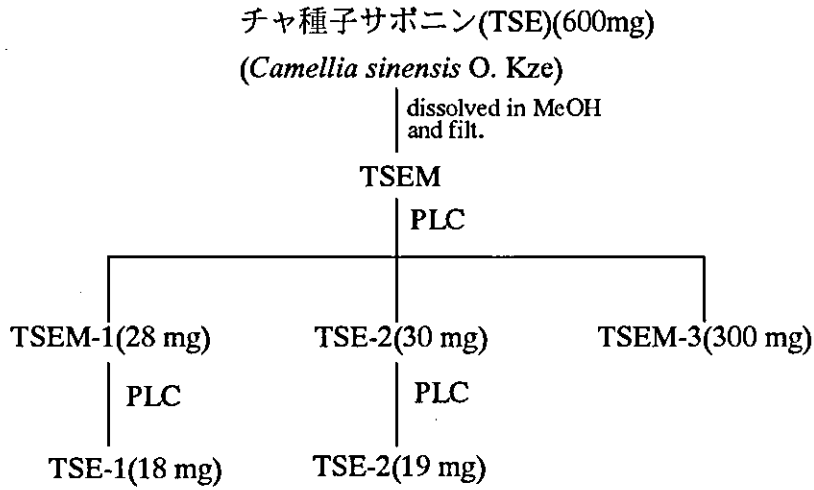


図1 チャ種子サポニン成分分離の流れ

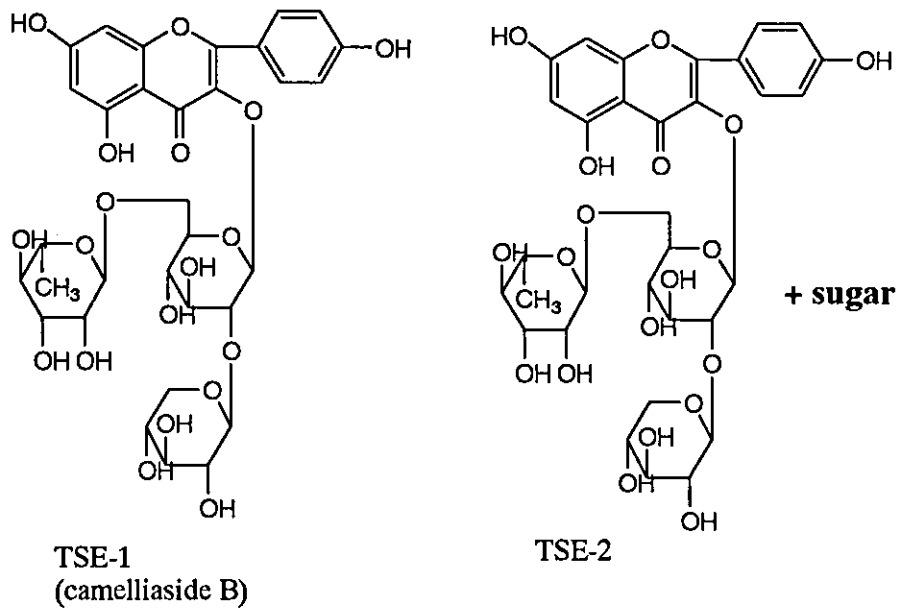


図2 チャ種子サポニンから得られたフラボン配糖体

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
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

平成 16 年度協力研究報告書  
パフィア抽出物の成分に関する研究

研究協力者 黒柳 正典 広島県立大学生物資源学部 教授  
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 本年度の担当品目であるパフィア抽出物についてその成分検索を行った。その結果、パフィアの主成分として報告されている  $\beta$ -ecdysone およびオレアナン型トリテルペンサポニンの存在を明らかにした。

A. 研究目的

既存保存剤等の化学成分を明らかにし、その品質と安全性に対する問題の有無を明らかにする。その一環として、パフィア抽出物の成分検討を行った。

B. 研究方法

パフィア抽出物はロイヤルゼリーの褐変防止に用いられる製造用材であり、ヒユ科パフィア (*Pfaffia iresinoides* Sprengel) の根より微温時含水エタノールで抽出したものである。

提供された本品 (Lot. 40706) は水溶液として供給され、含水率 95% との報告であった。そこで、この水溶液から目的有機化合物フラクションを得るため、分子内に脂溶性構造を有する有機化合物に対して吸着能を有するダイアイオン HP 20 による分離を行った。パフィア抽出物 200 ml を蒸留水で置換した HP 20 カラムに付し、蒸留水で十分に洗浄後メタノールで溶出した。メタノール溶出液は減圧下 50°C で濃縮して目的フラクション (PEM) 610 mg を得た。PEM は薄層クロマトグラフィー (TLC) の分析で、UV 吸収及び硫酸噴霧・加熱発色で比較的明確なスポットが認められたので、UV 吸収および発色を指標として分取 TLC

(PLC) を行った。実験は Merck silica gel 60 F<sub>254</sub>, 200 x 200 x 0.5 mm, 展開溶媒として CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 25 : 10 : 1 を用いて行った。UV 照射で UV 吸収を示す PEM-1 (Rf 0.7 付近) および 硫酸噴霧・加熱発色を示す PEM-2 (RF 0.2 から原点付近) の 2 つのフラクションに分けた。それぞれのフラクションを逆相系 ODS カラム (Mightysil RP-18, 関東化学) を用いた HPLC によりさらに精製した。溶出溶媒としてアセトニトリル-水系 (25 : 75) の溶媒を用い、210 nm を検出波長として HPLC を行うことにより成分の分離精製を行った。分離の流れについては図 1 に示す。

分離した化合物については質量分析 (MS) 及び核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを測定し、特に 2 次元 NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC 等) データを詳細に解析することによりその構造を決定した。

C. 研究結果

HPLC による分離精製を丹念に行った結果、PEM-1 から PE-1 (40 mg) を得た。PEM-2 からは PE-2 (30 mg) および PE-3 (34 mg) を得た。これら化合物は HPLC 分析 (ODS YMC Pack Pro C-18, 4.6 x 250 mm, 25 %

CH<sub>3</sub>CN, 210 nm detection) においてリテンションタイムはそれぞれ、PE-1 6.7 分、PE-2 5.4 分、PE-3 7.2 分である。これら3つの化合物は TLC 上でワンスポットを示す純度で分離することが出来た。TLC 上での RF 値は CHCl<sub>3</sub>·MeOH·H<sub>2</sub>O = 25 : 10 : 1 の溶媒で展開しそれぞれ、PE-1 0.71, PE-2 0.47, PE-3 0.42 であった。NMR を中心とするスペクトルデータの詳細な検討を行った。PE-1 はネガティブ FAB-MS で *m/z* 479 に [M·H]<sup>-</sup> と考えられる疑似親イオンが認められること及び、ESI-MS で *m/z* 463 に [M+H·H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> と思われるフラグメントが認められることから分子式は C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>7</sub> と推定される。<sup>1</sup>H-NMR においては4本のシングレットメチル基 δ 1.07, 1.23, 1.37, 1.59 が認められ、このうち δ 1.37 のシグナルは2本分のメチル基に相当することから5本のメチル基の存在が分かる。<sup>13</sup>C-NMR においては、27本のシグナルが認められ、この内7本のカルビノール炭素 δ 67.9, 68.0, 69.3, 76.7, 77.4, 84.0、1本のカルボニール炭素 δ 203.3, 2本のオレフィン炭素 δ 123.1, 165.9 が認められ、δ 165.9 のかなり低磁場シフトした値とカルボニール炭素がやや高磁場にシフトしていることから α,β-不飽和ケトンの存在が明らかになった。以上の結果から PE-1 は昆虫の代表的な脱皮ホルモンである β-ecdysone であることが推定された。2次元 NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC) の詳細な解析の結果もこのことを支持している。PE-2 はスペクトルデータから完全に構造を解析することが出来なかったが、脱皮ホルモンであるステロイド誘導体の可能性が示された。PE-3 は <sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて7本のシングレットメチル基 δ 0.79, 0.84, 0.90, 0.92, 0.94, 1.04, 1.15、オレフィンプロトン δ 5.24 (1H, t, *J* = 3.5 Hz)、2

本のアノメリックプロトン δ 4.32 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.34 (1H, d, *J* = 8.0 Hz) が認められることから PE-3 は oleanolic acid 誘導体のジグリコไซด์と推定される。<sup>13</sup>C-NMR スペクトルにおいて41本のシグナルが認められ、カルボキシル基 δ 176.7、オレフィン炭素 δ 122.5, 143.4, アノメリック炭素 δ 94.3, 105.4 及グルコシル基、キシロシル基に基づくと思われるシグナルが認められること、さらに HMBC 実験に於いて、アノメリックプロトンの一つは3位のカルビノール炭素と、もう一つのアノメリックプロトンは28位のカルボキシル基炭素と相関を示した。以上の結果、PE-3 は oleanolic acid の3位及び28位に glucose 或いは xylose が結合したトリテルペンサポニンであることが推定される。HMBC スペクトルにおいて一部データに不十分な点があり、正確な構造決定のためにはさらに2次元 NMR の詳細な解析と MS データの解析が必要である。

#### D. 考察

今回試験を行ったパフィア抽出物中の主成分としては、既存添加物リスト等にはエクダイソンおよびオレアナン型トリテルペンサポニンがその主成分であるとの記述がある。今回 β-ecdysone およびオレアナン型トリテルペンサポニンが得られたことはその記述に一致する結果であった。しかしパフィアの成分研究に関して、文献的には、その黄色色素として α-pyrone 環を有する特異的な構造のフェノール性誘導体の報告があるが、今回そのような化合物の存在は確認できなかった。今回用いたサンプルの水分含量が5%といわれていたが、HP 20カラムクロマトグラフィーの結果目的有機物フラクションの収量が200 ml のパフィ



ア抽出物から 610 mg とかなり低かったことから含水量はさらに高いものと考えられる。また、このようにエキス含有量が低かった結果3種の化合物以外の微量成分を分離することが出来なかった。

なお、既存添加物名簿にはパフィアの実植物名の属名を *Paffia* としているが、*Pfaffia* の間違いと思われる。とすると、英名も *Pfaffia extract* とすべきと考えられる。

#### E. 結論

今回検討したパフィア抽出物からはその主要成分とされている  $\beta$ -ecdysone, オレアナン型トリテルペンサポニンが分離されたことにより、市場品のパフィアの根を原料として調整された物と考えることが出来る。以上の結果、本品はパフィア抽出物として問題がないことが明らかになった。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

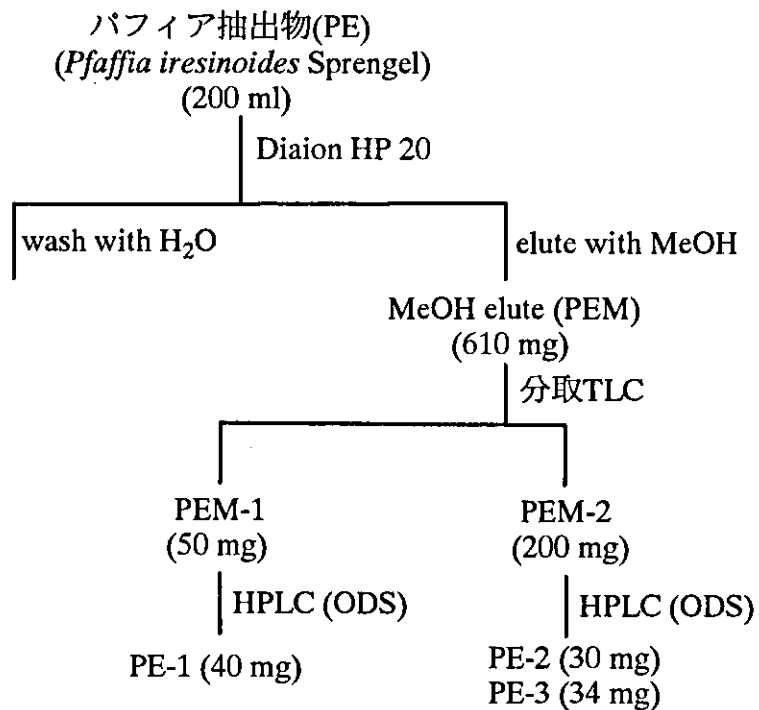


図1 パフィア抽出物分離

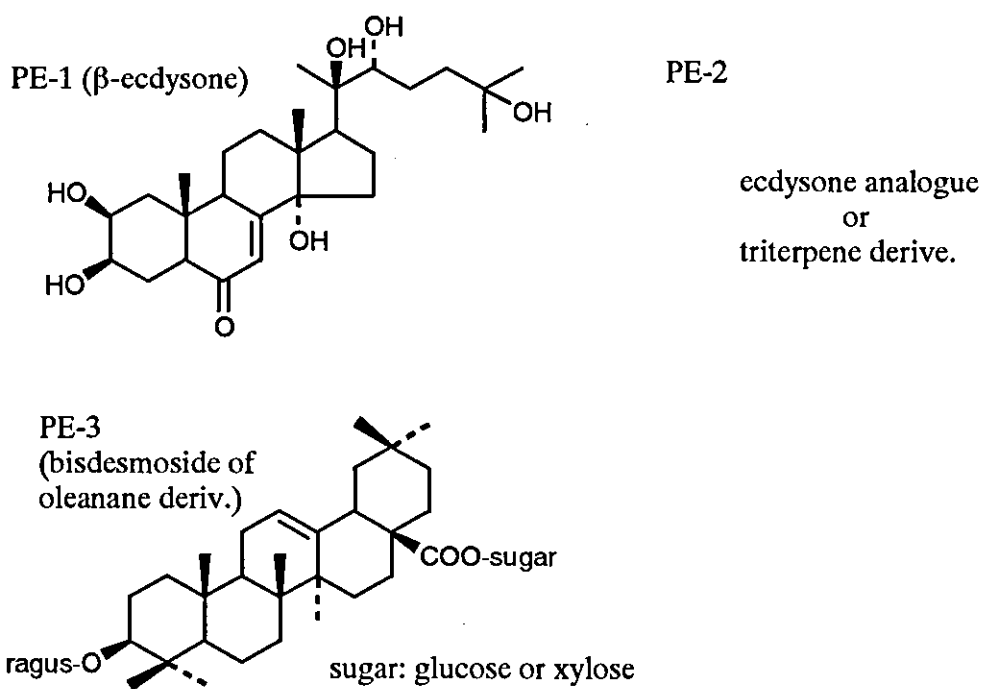


図2 分離化合物の構造

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
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

平成 16 年度協力研究報告書  
ヒキオコシ抽出物の成分に関する研究

研究協力者 黒柳 正典 広島県立大学生物資源学部 教授  
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

研究要旨；昨年度担当品目であったヒキオコシ抽出物につて、既にヒキオコシの同属植物成分に特徴的成分であるジテルペン 3 種類を分離構造決定しているが、その主成分といわれる enmein が分離されていないため、その存在の有無を検討した。

#### A. 研究目的

既存保存剤等の化学成分を明らかにし、その品質と安全性に対する問題の有無を明らかにする。ヒキオコシ抽出物の成分検討を行った。

#### B. 研究方法

ヒキオコシ抽出物はシソ科ヒキオコシ (*Isodon japonica* Hara) の茎又は葉をメタノール抽出して作成したものである。供給されたヒキオコシ抽出物 (Lot. IY0383) について図 1 に示すような方法で成分の分離を行った結果、昨年度の研究成果として 1 種類の化合物 IJ-1 の分離を行っている。本年度のその後の研究で図 1 に示すように、IJE A-3, IJE A-4, IJE A-6, IJE A-7 のフラクションを分取 TLC (PLC) および逆相系カラム (Mightysil RP-18, 20 x 250 mm, 関東化学) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行うことによりさらには 7 種類の化合物を分離した。それらのうち 4 種類の化合物について構造解析を行った。構造決定については質量スペクトル (MS) および核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを中心とするスペクトルデータの解析により構造決定を行った。しかしながらヒキオコシの主成分と報告され、

既存添加物リスト中でも主成分と記載されている enmein の分離には至っていない。そこで、enmein 標準品と生薬エンメイソウ (ヒキオコシを乾燥したもの) を入手し、ヒキオコシ抽出物中における enmenin の有無及び本品と生薬エンメイソウとの成分比較を行った。生薬エンメイソウとヒキオコシ抽出物をそれぞれメタノールで熱時抽出し、メタノールエキスを得た。メタノールエキスはそれぞれ減圧下 50℃で濃縮しその一部をメタノールに溶解して薄層クロマトグラフィー (TLC) に用いた。Enmein 標準品についてもその少量をメタノールに溶解して標品として用いた。これらメタノール溶液をそれぞれシリカゲル TLC (Merck, silica gel 60 F<sub>254</sub>) により分析した。展開溶媒としては CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 9 : 1 を用いて行った。

#### C. 研究結果

本試験サンプルであるヒキオコシ抽出物から昨年度の IJ-1 (1150 mg) に加えて、本年度は IJ-2 (840 mg), IJ-3 (108 mg), IJ-4 (40 mg), IJ-5 (120 mg), IJ-6 (25 mg), IJ-7 (70 mg), IJ-8 (80 mg) が得られた。これら化合物は TLC 上ワンスポットとして認められた。

CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 30 : 1 を展開溶媒とした時、この内構造が明らかとなった化合物の R<sub>f</sub> 値はそれぞれ、IJ-1 は 0.39, IJ-2 は 0.35, IJ-3 は 0.28, IJ-4 は 0.17, IJ-5 は 0.12 であった。

IJ-2 は <sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて、2本のダブルットメチル基、5本のシングレットメチル基の存在が分かり、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルにおいて、カルピノール炭素、カルボキシル基、オレフィングループが一つずつ存在することが分かり、最終的には ursolic acid と決定した。IJ-3 は FAB-MS から C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub> の分子式が推定された。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいては、IJ-1 と類似したエントカウレン型のジテルペン誘導体であることが推測され、アセチル基の存在が判り、IJ-1 とは異なり 2 置換オレフィングループが存在していないことが判った。<sup>13</sup>C-NM スペクトル、2次元 NMR (HMQC, HMBC) の詳細な検討により既知化合物である maocystal A であると決定した。IJ-4 は FAB-MS から分子式は C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub> で、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいては、メトキシ基 2つ、パラヒドロキシフェニルグループ、シングレットプロトン 2つの存在が判り 4,5-dihydroxy-7,8-dimethoxyflavone と推定した。IJ-5 は FAB-MS から分子式は C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub> と推定された。<sup>1</sup>H-NMR においては IJ-1 と非常によく似たシグナルを示しているがシングレットメチル基が 1つしか認められず、その代わりに非等価なプロトンを持つヒドロキシメチル基の存在が認められた。<sup>13</sup>C-NMR スペクトルにおいては、新たに 1級カルピノールの存在が明らかになり、2次元 NMR (HMBC) において唯一のメチルグループが 1級カルピノール炭素と相関を示したことから、IJ-1 のメチル基のどちらかがヒドロキシメチル基になった構造と考えられた。この構造は

2次元 NMR の詳細な解析により確認した。以上の結果から構造が明らかになっている化合物の構造と enmein の構造を図 2 に示す。

今回調整したヒキオコシ抽出物のメタノール溶液、生薬エンメイソウのメタノール溶液、標準品 enmein のメタノール溶液を TLC で分析した結果、ヒキオコシ抽出物のメタノール溶液、生薬エンメイソウのメタノール溶液中には enmein のスポットに相当する物質の存在が観察されなかった。一方、ヒキオコシ抽出物のメタノール溶液と生薬エンメイソウのメタノール溶液は同じ TLC パターンを示した。TLC 展開後 50 % 硫酸噴霧・加熱により発色させた TLC の結果を図 3 に示す。

#### D. 考察

今回試験を行ったヒキオコシ抽出物中からはヒキオコシの主成分と報告されている enmein を分離することは出来ていない。文献上の研究成果としても、公定書などにおいてもヒキオコシの主成分は enmein であること記載されている。そこで標準品 enmein を入手してヒキオコシ抽出物中における存在の有無を検討した結果 TLC 上 (図 3) では存在が確認できなかった。市販されている生薬エンメイソウ (ヒキオコシ) との TLC における比較で、この材料中にも enmein の存在は確認されなかった。しかしヒキオコシ抽出物と生薬エンメイソウでは同じ TLC パターンが観察された。このことは、本製品は流通しているヒキオコシを原料として製造されたものであると考えられるのが妥当である。しかしながら、ヒキオコシの主成分が enmein であると種々の文献に記載されているにもかかわらず本製品および生薬エンメイソウから確認できなかったことはどのように解釈できるであろうか。文献上の混乱か、研究に