

用いられたヒキオコシの種の同定が混乱しているか、複数の起源植物に起因するヒキオコシが市場に流通しているためか、色々の原因が考えられるが、確かな原因は明らかでない。日本薬局方では、生薬エンメイソウとして同属植物が用いられることも許容されているため、いわゆるヒキオコシといわれている生薬材料の起源植物が複数あり、それらの間で enmein 含有の有無に差がある等の原因も考えられる。

E. 結論

今回検討したヒキオコシ抽出物からは enmein は分離されず、またその存在も確認できなかった。しかしながら *Isodon* 属類縁植物に特徴的なエントカウレン型ジテルペンが分離されたことおよび、市販の生薬エンメイソウにおいても enmein の存在が確認されず、ヒキオコシ抽出物と生薬エンメイソウは TLC で非常によく似たパターンを示していることから、今回試験を行ったヒキオコシ抽出物は市場品の

ヒキオコシを原料として調整された物と考えることが出来る。また、いわゆるヒキオコシといわれる市場品に広く同属類縁植物が使われ、enmein を含まないものがある可能性が考えられる。

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

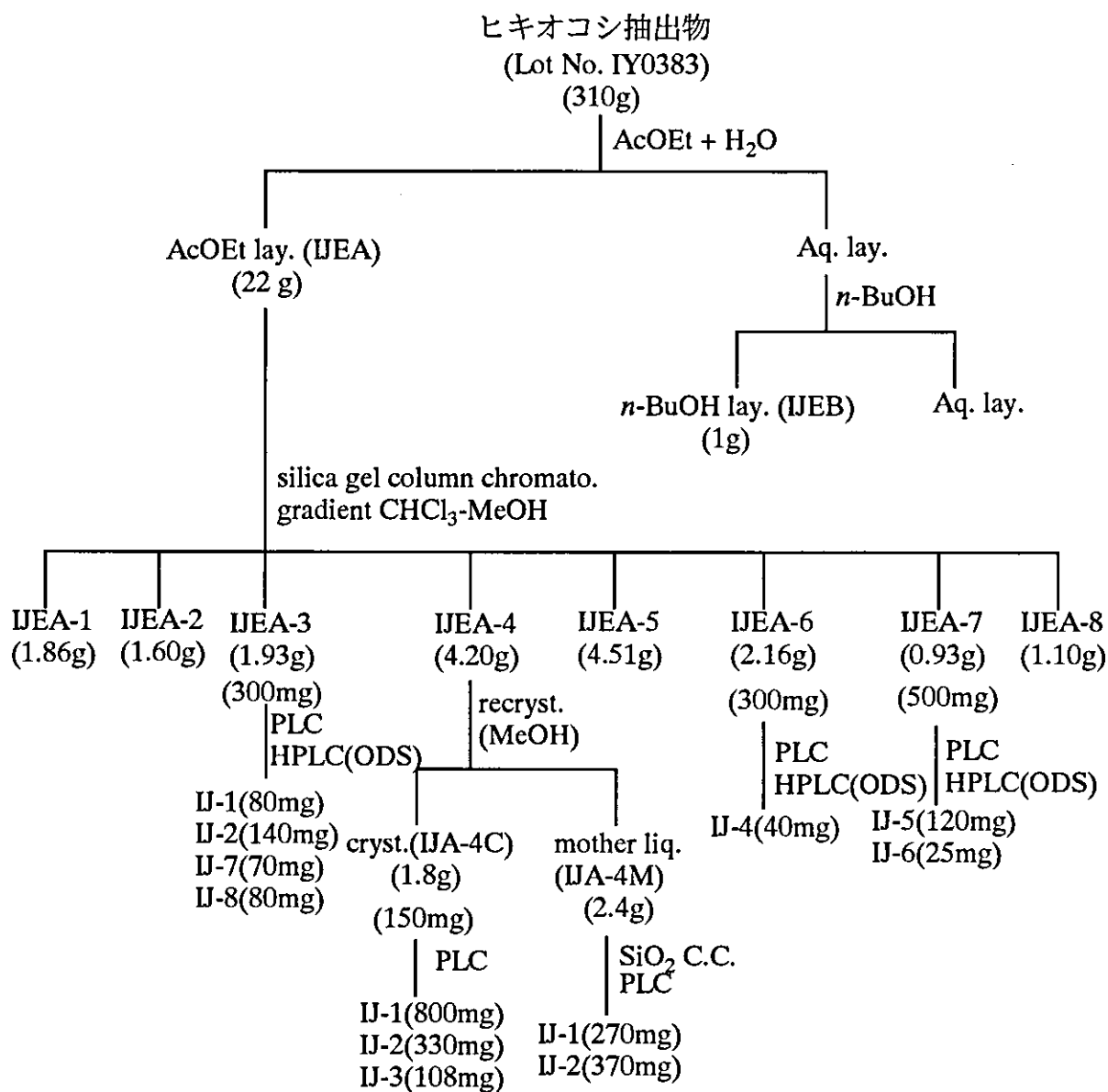


図1. ヒキオコシ抽出物の抽出分離過程

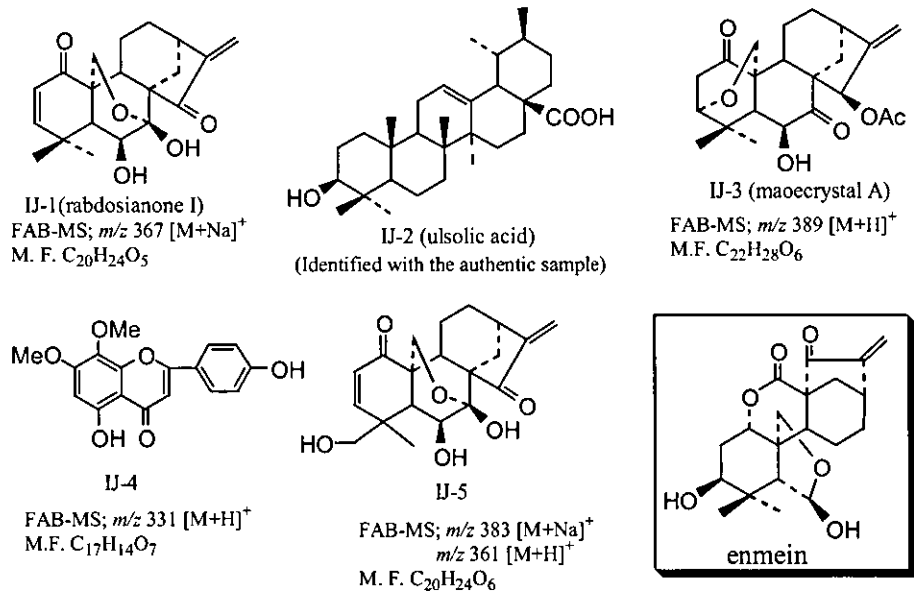
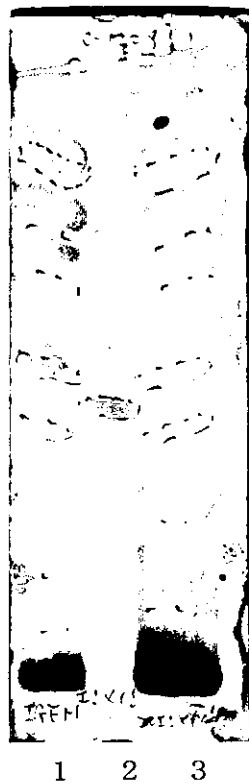


図2 ヒキオコシ抽出物から分離された化合物および enmein の構造



- 1 ヒキオコシ抽出物
2 enmein
3 生薬エンメイソウ

図3 TLC による enmein の確認

ヒキオコシ抽出物、生薬エンメイソウには enmein の存在が認められない

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 年度分担研究報告書
エラグ酸の成分・品質に関する研究

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 既存添加物「エラグ酸」(酸化防止剤)の規格作成に関する基礎的研究を行った。市販の「エラグ酸」製品中の水分含量を求めると乾燥減量を測定したところ、 $1.36 \pm 0.41\%$ とエラグ酸標準品と比較して水分含量が低いことが明らかとなった。「エラグ酸」製品の ^1H -及び ^{13}C -NMR 測定したところ、化学シフト値は、エラグ酸(試薬)のもの一致した。また、試薬をもとに「エラグ酸」製品中のエラグ酸を定量したところ、その乾燥品中のエラグ酸含量は $99.6 \pm 2.0\%$ であることが明らかになった。更に、HPLC のグラジエント溶出により不純物の混在を確認したところ、エラグ酸以外にピークは検出されず、「エラグ酸」製品中のエラグ酸純度が非常に高いことが確認された。

研究協力者

酒井信夫 千葉大学大学院薬学研究院 助手

エラグ酸の規格作成に関する基礎的検討を行うため、市販「エラグ酸」製品を入手し、その成分に関する研究を行ったので報告する。

A. 研究目的

エラグ酸(Fig. 1; 2, 3, 7, 8-Tetrahydroxy [1] benzo-pyrano [5, 4, 3-cde][1]benzopyran-5, 10-dione; 4, 4', 5, 5', 6, 6'-Hexahydroxydiphenic acid 2, 6, 2', 6'-dilactone)は、既存添加物名簿収載品目リストに、酸化防止剤として収載され、その基原、製法、本質として、「フトモモ科ユーカリ(*Eucalyptus globulus* LABILL)などの葉、ヒシ科のヒシ(*Trapa japonica* FLEROV.)の実、ウルシ科ヌルデ(*Rhus javanica* L.)に発生する五倍子、ミロバラン(*Terminalia chebula* RETZ.)の実などを脱脂後、水又はエタノールで抽出して得られたものである。成分はエラグ酸である。」と記載されている(既存添加物名簿番号, 56)。添加物としての用途として油脂系食品とあるが、食品への応用例は少ない。その一方で、エラグ酸は果実などの天然食品に常在成分として含有されており、我々の日常生活に密接な関係がある。また、抗酸化物質、チロシナーゼ阻害物質として健康食品、化粧品等へ配合されている。本研究では、既存添加物

B. 研究方法

試料及び試薬

市販「エラグ酸」製品は日本食品添加物協会より入手した。エラグ酸(試薬)はSigma社製(from Tree Bark, H₂O content 9%)及び和光純薬工業社製(エラグ酸二水和物)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。NMR 溶媒はDimethyl-*d*₆ Sulfoxide 99.9% (Isotec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: SPD-6A, カラムオープン: Water Bath Incubator BT-22) に、イン

テグレータとして Hitachi Chromato Integrator D-2500 を接続したものを用い、下記条件で測定した。また、「エラグ酸」製品中の不純物の測定にはフォトダイオードアレイ検出器(Otsuka Electronics MCPD-3600)を用いた。

[製品中エラグ酸の定量]

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 x 250 mm, GL Sciences 社製), 移動相: 5 mmol/L リン酸二水素カリウム (pH 2.5) - アセトニトリル (41 : 9), 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出波長: 紫外 360 nm.

[製品中不純物の測定]

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 x 250 mm, GL Sciences 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→50%B (0→30 分); 50→85%B (30→35 分); 85→85%B (35→40 分); 85→90%B (40→50 分), 90→100%B (50→55 分); 100→100%B (55→70 分), 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出波長: 200-400 nm.

紫外可視分光光度計は UV-1200(島津製作所製)を用いた。NMR は, JNM-ECP600(JEOL 製)を用いた。¹H-及び¹³C-NMR のケミカルシフト値は 35°C測定における *d* 溶媒ピーク($\delta^1\text{H}$; 2.50, $\delta^{13}\text{C}$; 39.5)に対する δ 値 (ppm)で示した。

乾燥減量の測定

第7版 食品添加物公定書解説書に記載されている方法に準じて測定した。予め秤量瓶を 105°Cで 30 分間加熱し、デシケーター内で 30 分間放冷した後、精密に重量を測定した。この秤量瓶に、「エラグ酸」製品及びエラグ酸(試薬)を精密に 100 mg ずつ量りとり(n = 3), 105°Cで 2 時間加熱し、デシケーター内で 30 分間放冷した後、精密に乾燥減量を測定した。

HPLC 分析用試料溶液の調製

エラグ酸二水和物 (min. 99.0%, 和光純薬工業社製生化学用) 56 mg を精密に重量測定し、エタノール

を加え正確に 50 mL(エラグ酸として 1 mg/mL)とし、標準原液とした。これを適宜メタノールで希釈し、標準溶液とした。「エラグ酸」製品は 100 mg を精密に重量測定し、エタノールを加え正確に 100 mL とし、これを適宜メタノールで希釈したものを「エラグ酸」製品試料溶液とした。

検出はエラグ酸が紫外部に吸収を有することから UV 検出器を用い、測定波長は移動相溶媒中での λ_{max} が 255, 360 nm 付近であることから(Fig. 2), 夾雑物質による妨害ピークが少ないと考えられる 360 nm で測定した。標準溶液及び試料溶液は各濃度注入量 10 μ L のピーク高さより作成した絶対検量線より、「エラグ酸」製品及びその乾燥品中のエラグ酸を定量した。

C. 研究結果及び考察

乾燥減量の測定

Sigma 社エラグ酸(試薬), 和光純薬工業社エラグ酸二水和物(試薬)及び「エラグ酸」製品の乾燥減量はそれぞれ 9.12 ± 0.17 , 11.00 ± 0.90 , $1.36 \pm 0.41\%$ であった。Sigma 社製試薬は表記された水分含量(9%)と同等の値が得られた。また、「エラグ酸」製品の水分含量はエラグ酸(試薬)と比較して非常に低いことから、食品添加物としての製造工程における噴霧乾燥等の影響が考えられた。

「エラグ酸」製品中主化合物の同定

「エラグ酸」製品中に含まれる主化合物を同定するために、まず、「エラグ酸」製品及びエラグ酸(試薬)の紫外吸収を分析した。その結果、両者は 255, 360 nm 付近に極大吸収を示し、波長パターンが一致した(Fig. 2)。更に、両者の¹H-及び¹³C-NMR を測定したところ、それらのケミカルシフト値も完全に一致したことから、「エラグ酸」製品中に含まれる主化合物がエラグ酸であることが明らかとなった。また、¹³C-NMR 上では、不純物由来と考えられるピークはほとんど観測されず、

¹H-NMR 上でも、水以外の有意な不純物ピークはほとんど観測されなかった。

NMR データ

「エラグ酸」製品: 灰色結晶性粉末, ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.47 (2H, *s*, H-5 and H-5'), ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 159.0 (C-7 and C-7'), 148.1 (C-4 and C-4'), 139.5 (C-3 and C-3'), 136.3 (C-2 and C-2'), 112.2 (C-1 and C-1'), 110.2 (C-5 and C-5'), 107.6 (C-6 and C-6').

エラグ酸標準品(Sigma 社製): 黒色結晶性粉末, ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.47 (2H, *s*, H-5 and H-5'), ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 159.0 (C-7 and C-7'), 148.1 (C-4 and C-4'), 139.5 (C-3 and C-3'), 136.3 (C-2 and C-2'), 112.2 (C-1 and C-1'), 110.3 (C-5 and C-5'), 107.6 (C-6 and C-6').

エラグ酸標準品(二水和物, 和光純薬工業社製): 白色結晶性粉末, ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.47 (2H, *s*, H-5 and H-5'), ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 159.0 (C-7 and C-7'), 148.1 (C-4 and C-4'), 139.5 (C-3 and C-3'), 136.3 (C-2 and C-2'), 112.2 (C-1 and C-1'), 110.3 (C-5 and C-5'), 107.6 (C-6 and C-6').

「エラグ酸」製品中のエラグ酸の定量

「エラグ酸」製品中のエラグ酸を定量するために、和光純薬工業社製エラグ酸二水和物(試薬)(C₁₄H₆O₈·2H₂O = 338.2 / C₁₄H₆O₈ = 302.2) 56 mg を精密に重量測定し、正確に 50 mL(エラグ酸として 1 mg/mL)として標準原液を作成し、検出波長 360 nm におけるピーク面積から絶対検量線を作成した。「エラグ酸」製品及びその乾燥品(0.5 mg/mL)のピーク高さを測定し、エラグ酸二水和物標準品より作成した検量線より各相当量を算出したところ、0.494±0.018 mg/mL 及び 0.498±0.010 mg/mL という値が得られた。従って、「エラグ酸」製品中のエラグ酸純度は 98.8±3.6%、乾

燥品中エラグ酸純度は 99.6±2.0%であると計算され、「エラグ酸」製品の純度が非常に高いことが明らかとなった。

「エラグ酸」製品中の不純物の測定

前項の結果より、「エラグ酸」製品の純度が高いことが明らかとなった。しかしながら、乾燥による減量分が全て製品中の水分によるものか否かは明らかでなく、乾燥により揮発されやすい他の不純物が混在している可能性は否定できなかった。そのため、「エラグ酸」製品をグラジエント溶出による HPLC で分離し、200-400 nm の領域でエラグ酸以外のピークが認められるか否か検討した。その結果、紫外領域においてエラグ酸以外に主だったピークは認められず(Fig. 3)、「エラグ酸」製品中のエラグ酸純度が非常に高いことが確認された。

D. 結論

既存添加物「エラグ酸」製品(酸化防止剤)の成分分析を行った。エラグ酸製品中の水分含量を求めるため乾燥減量を測定したところ、1.36±0.41%とエラグ酸(試薬)と比較して水分含量が非常に低いことが明らかとなった。「エラグ酸」製品を ¹H-及び ¹³C-NMR により測定したところ、エラグ酸標準品のケミカルシフト値と完全に一致した。また、「エラグ酸」製品のエラグ酸を二水和物の試薬を標準として定量したところ、乾燥品中のエラグ酸含量は 99.6±2.0%であることが明らかになった。更に、HPLC のグラジエント溶出により不純物の混在を確認したところ、エラグ酸以外に主だったピークは検出されず、「エラグ酸」製品中のエラグ酸純度が非常に高いことが確認された。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

なし

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

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).

天倉吉章, 辻澄子, 外海泰秀. 平成 11 年度食品添加物規格基準設定費報告書, 食品中の添加物分析法の設定 エラグ酸の分析法.

第 7 版 食品添加物公定書解説書 (2000) X-C. Li, H. N. Elsohly, C. D. Hufford and A. M. Clark, *Magnetic Resonance Chemistry*, **37**, 856-859 (1999).

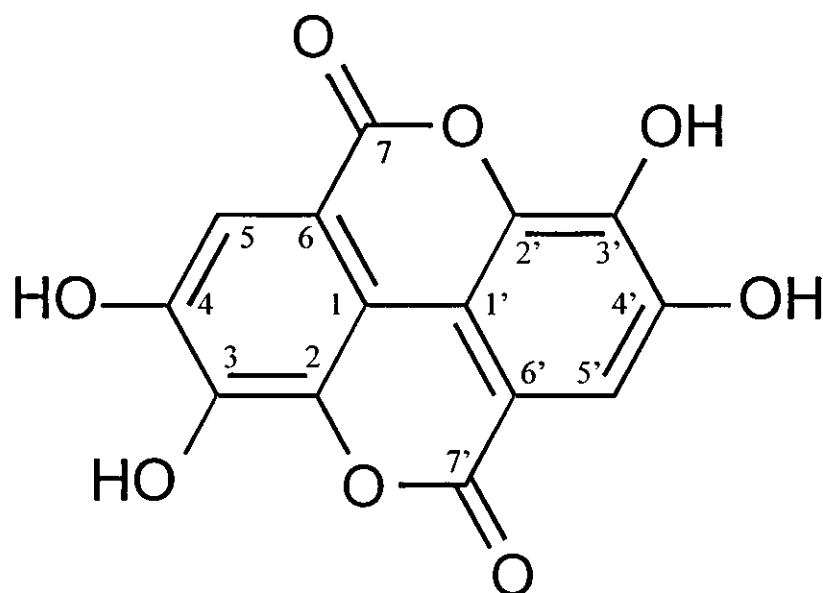


Fig. 1 Chemical structure of ellagic acid

$C_{14}H_6O_8$, Mw. 302.19

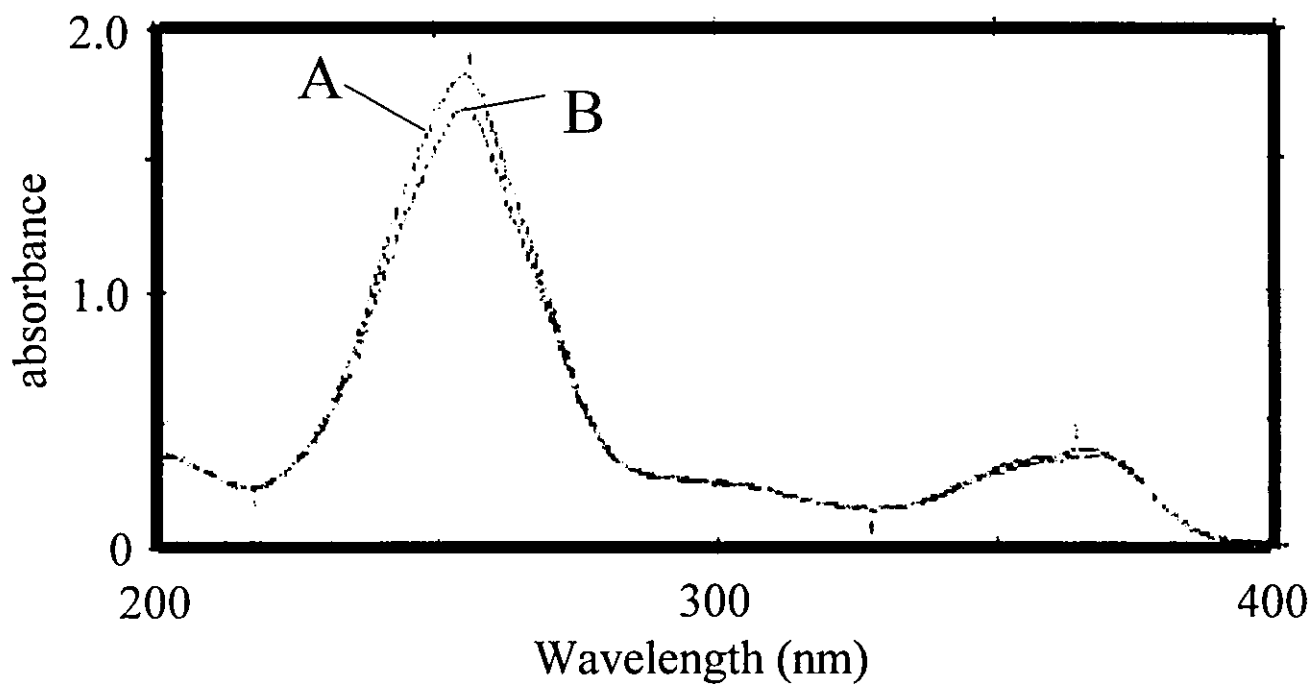


Fig. 2 UV spectra of ellagic acid

A: reagent (Wako, dihydrate); B: commercial food additive sample

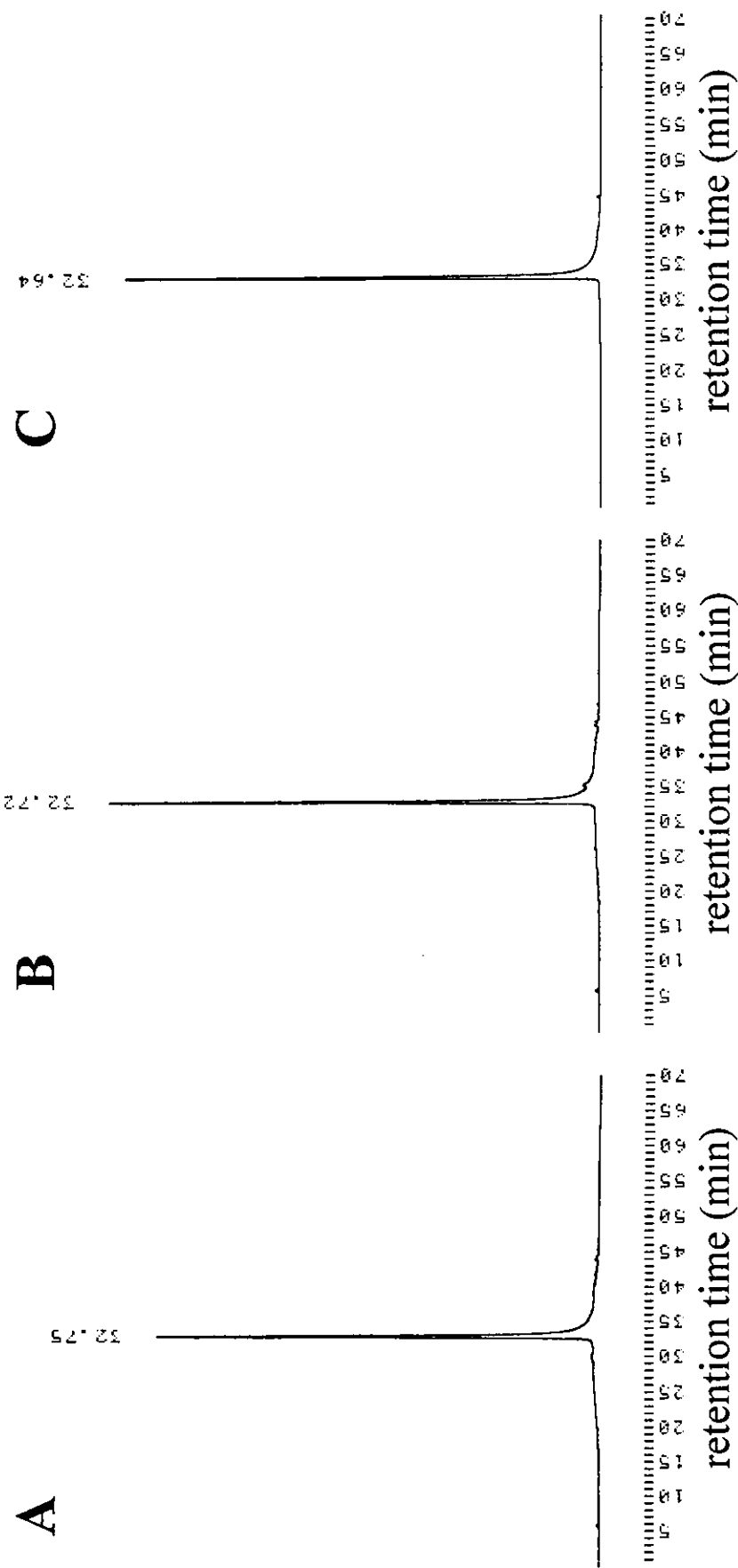


Fig. 3 Chromatograms of ellagic acid samples

A: commercial food additive sample, B: reagent (Sigma), C: reagent (Wako, dihydrate)
 HPLC conditions: column, Inertsil ODS-3 (4.6 x 250 mm); flow rate: 1.0 mL/min; mobile phase A, 5% AcOH; mobile phase B, MeOH; gradient program, 0→50%B (0→30 min), 50→85%B (30→35 min), 85%B (35→40 min), 85→90%B (40→50 min), 90→100%B (50→55 min), 100%B (55→70 min); column temperature, 40°C; detection, PDA (UV 270 nm).

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 年度分担研究報告書

既存添加物「アルカネット色素」の成分と基原種に関する研究

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 アルカネット色素の成分及び基原種について基礎的検討を行った。その結果、本色素の本体が、shikonin 及びその各種エステル化体であることを確認した。また、原料植物が、*Anchusa officinalis* L. ではなく、別のムラサキ科植物であることを示す結果を得た。さらに、文献検索の結果、アルカネットの基原植物には *Anchusa* 属及び *Alkanna* 属植物の双方を含める指定をすることが望ましいと考えられた。

研究協力者

酒井信夫 千葉大学大学院薬学研究院 助手
丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部研究員

った。また、アルカネットの基原植物について文献検索を行い、その基原種として指定することが妥当な植物の範囲を調査した。

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。本研究では、公的な成分規格のない既存添加物「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、市販アルカネット色素及びその原料粉末を手し、成分及び基原種に関する研究を行った。前年度の調査において、市販のアルカネット色素の本体は、alkannin とは、逆の立体配置 (*R*-configuration) を持つ shikonin とそのエステル化体であることが示唆された。そこで、今年度は、引き続き、成分分析を行い、エステル化体の立体異性体比を明らかにするとともに、アルカネット色素の原末より、genomic DNA を抽出し、rDNA の ITS1 領域の塩基配列を、*Anchusa officinalis* の標品及びデータベース上のものと比較することにより、アルカネット色素原料の基原種の調査を行

B. 研究方法

B-1 実験材料

アルカネット色素及びその原末は市販(大阪化学合金株式会社、現 OCI 株式会社)のものを用いた。*Anchusa officinalis* 及び *Borago officinalis* の標品には、東京都薬用植物園にて栽培されたものを用いた。

B-2 アルカネット色素成分の加水分解

加水分解反応は、Fukui らの報告¹⁾に準じる方法にて行った。すなわち、昨年度、アルカネット色素より単離した compound B-E (図1)、各 1 mg 及びアルカネット色素メタノール抽出物 20 mg をそれぞれ、メタノール 1 mL に溶解し、1N NaOH、3 mL を加え、終夜、室温で攪拌した。反応液に、1N HCl、3 mL を加え、中和した後、CHCl₃ で反応生成物を抽出し、減圧乾固した。このものを analytical HPLC (条件 1) に供し、未反応のエステル体が残存しないことを確認した後、preparative HPLC に供することにより、shikonin/alkannin 画分を精製した。得られた画分を、キラルカラムを用いた analytical HPLC

(条件 2) に供することにより、shikonin/alkannin の異性体比を決定した。分析及び分取 HPLC の条件は、以下の通りである。分析 HPLC (条件 1): 装置、LC-VP system (LC-10ATvp x 2, CTO-10Avp, SPD-M10Avp, SPD-10AVvp; Shimadzu); カラム、Inertsil ODS-3 (4.6 x 250 mm, 5 µm; GL Sciences); 移動相、0.1% ギ酸 -MeOH = 23 : 77; 流速、0.8 mL/min; 検出波長、520 nm (VIS)、190-600 nm (PDA)。分析 HPLC (条件 2): 装置、Gulliver series (PU-980 x 2, CO-965, UV-970, CD-2095; JASCO); カラム、Chiralcel-OJ (4.6 x 250 mm; Daicel Chemical Ind.); 移動相、hexane-isopropanol-AcOH = 95-5-0.3; 流速、0.65 mL/min; 検出波長、520 nm (VIS)、355 nm (CD)。分取 HPLC: 装置、LC-VP system (LC-10ATvp x2, CTO-10Avp, SPD-M10Avp, SPD-10AVvp; Shimadzu); カラム、Inertsil PREP-ODS (20 x 250 mm, 5 µm; GL Sciences); 移動相、0.1% ギ酸 (A)-MeOH (B) = 74% B (0-20 min)、74-90% B (20-40 min)、90-74% B (40-60 min)、74% B (60-80 min); 流速、4 mL/min; 検出波長、520 nm (VIS)、190-800 nm (PDA)。

B-3 DNA 分析

各乾燥試料約 30 mg より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。得られた genomic DNA 溶液の内、アルカネット色素原料由来のものに関しては、SUPREC-2 (Takara Bio) を用いたフィルター過により抽出液に混入した色素の除去を行なった。それぞれの DNA を鋳型として二段階の PCR を行なうことにより、rDNA の ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) 領域の増幅を行なった。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分離後、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) により精製した。このものを ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンズに供することにより塩基配列解析を行なった。得られた塩基配列の多重整列解析は Clustal W プログラムを用いて行った。PCR に用いられた各プライマーの塩基

配列は、以下の通りである。

First PCR、

ITS-S1: 5'-CTTTATCATTAGAGGAAGGAG-3'、

ITS-AS1: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'; second PCR、

ITS-S2: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'、

ITS-AS1

C. 研究結果と考察

C-1 成分分析

アルカネット色素のメタノール抽出物及び各色素成分を加水分解し、得られた shikonin/alkannin 画分を精製した後、キラルカラムによる HPLC 分析を行った。分析例として異性体比が最も小さかった化合物 B についてのクロマトグラムを図 2 に示した。各化合物の鏡像異性体過剰率 (ee%) は、表 1 に示した通りであり、化合物 B において、alkannin 型の立体配置を持つものが、約 40% 認められた他は、全て shikonin 型の立体配置を持つものが、約 80% 以上含まれていた。また、条件 1 の HPLC 分析により求めたアルカネット色素中の各化合物の存在比を、それぞれの ee% について乗じた数値の和は、アルカネット色素のメタノール抽出物を加水分解することにより求めた ee% とほぼ一致した (表 1)。一方、*Anchusa officinalis* の標品の根から得た色素成分について HPLC 分析²⁾を行ったところ、図 3 のような結果が得られ、その組成は、アルカネット色素のものとよく似た構成であった。しかし、十分な量の色素を得ることが出来なかったため、その立体配置についての検討を行うことは、出来なかった。これは、今回用いた試料が若く、色素生成が十分に行われていなかったためであると思われる。

C-2 DNA 分析

アルカネット色素原料及び *Anchusa officinalis*、*Borago officinalis* の標品より genomic DNA を抽出し、rDNA の ITS1 領域の塩基配列解析を行った。その結果、*Anchusa officinalis* 及び *Borago officinalis* 標品の塩基

配列は、国際塩基配列データベース (GenBank、DDBJ、EMBL) に登録済みの対応する配列 (Accession no. AF531080、AY092898) と一致した (図 3)。一方、アルカネット色素原料の塩基配列は、データベース中に一致する配列は見出されなかった。このものについて Blast Search Program による相同性検索を行なったところ、*Echium vulgare*、*Ogastemma pusillum*、*Buglossoides purpureocaerulea* などムラサキ科に属する植物が上位であった。しかし、これらの種においても特に前半部において相当数の塩基に違いが見られた。以上のことから、今回の試験に使用したアルカネット色素原料の原植物は、*Anchusa officinalis* とは異なるムラサキ科の植物であると考えられるものの、それ以上、特定することは出来なかった。

アルカネット色素の基原植物について STN international による検索を行った結果、表 2 に示す結果が得られ、アルカネットとして、*Anchusa* 属植物とともに、*Alkanna tinctoria* が多く当てられていることが明らかになった。*Alkanna tinctoria* は、色素成分として alkannin 及びそのエステル体を含有することが示されている³⁾。また、The International Plant Name Index (IPNI)⁴⁾ により、これらの植物名を検索したところ、*Anchusa tinctoria* L. の異名 (synonym) として *Alkanna tinctoria* が見出される一方で、*Anchusa tinctoria* Woodv. の異名として *Anchusa officinalis* の名が認められ、これらの植物の分類が命名者により混乱していることが窺えた。既存添加物名簿収載品目リストの作成において、どのような経緯で、アルカネットに *Anchusa officinalis* L. のみを指定したかは不明であるが、上記のような考察から、アルカネットの基原植物には、*Alkanna tinctoria* Tausch を含めた広い指定をすることが望ましいと考えられる。

D. 結論

アルカネット色素について、成分化学及び分子生物学的手法を用いた調査を行った。その結果、本色素の本体

は、shikonin 及びその各種エステル化体であることが確認出来た。また、原料植物が、既存添加物名簿収載品目リストに記載されている *Anchusa officinalis* L. ではなく、別のムラサキ科植物であることを示す結果を得た。文献検索の結果、アルカネットの基原植物には *Anchusa* 属及び *Alkanna* 属植物が当てられており、さらに、これら植物の分類学上の位置が混乱している実態が確認された。

E. 参考文献

- 1) Fukui H., Tsukada M., Mizukami H., Tabata M., Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinone derivatives in *Echium lycopsis* callus cultures. *Phytochemistry*, **22**, 453-456 (1983).
- 2) 分析条件には、昨年度の合田の報告 (合田幸広、既存添加物「アルカネット色素」の成分に関する研究;厚生労働科学研究費補助金、「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 15 年度報告書) にある「条件 1」を用いた。ただし、流速を 1 mL/min とした。
- 3) Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Couladouros E. A., Hepworth D., Nicolaou K. C., The chemistry and biology of alkannin, shikonin and related naphthazarin natural products, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 270-300 (1999).
- 4) <http://www.ipni.org/index.html>: IPNI is a database of the names and associated basic bibliographical details of all seed plants. This system is produced by the collaboration between The Royal Botanic Gardens, Kew, The Harvard University Herbaria, and the Australian National Herbarium.

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

阪、2004年6月)

論文発表

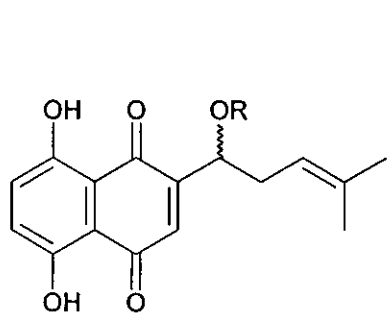
Sakai S., Maruyama T., Kawahara N., Goda Y., Studies on Main Pigments in Alkanet Color, a Natural Food Color. *Jpn. J. Food Chem.*, 12 (1), in press.

学会発表

既存添加物「アルカネット色素」の成分と基原種について: 丸山卓郎、酒井信夫、川原信夫、佐藤恭子、棚元憲一、合田幸広(日本食品化学学会第10回学術大会、大

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



	R	Name
A	H	shikonin/alkannin
B	Ac	acetyl
C		isobutyryl
D		3,3-dimethylacryl
E		isovaleryl

図1 アルカネット色素成分の化学構造

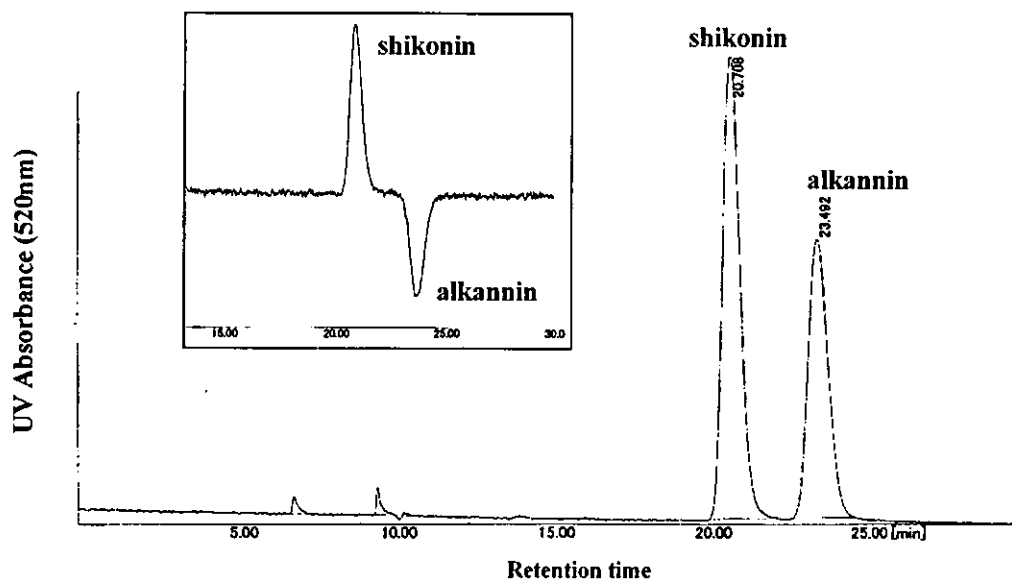


図2 化合物 B 由来 shikonin/alkannin 画分のクロマトグラム

枠内は、CD 検出器におけるクロマトグラム

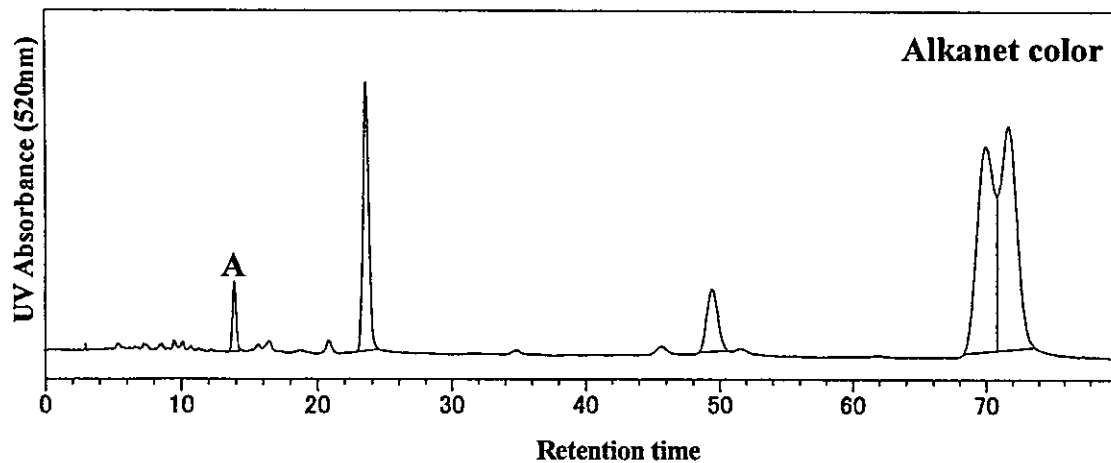
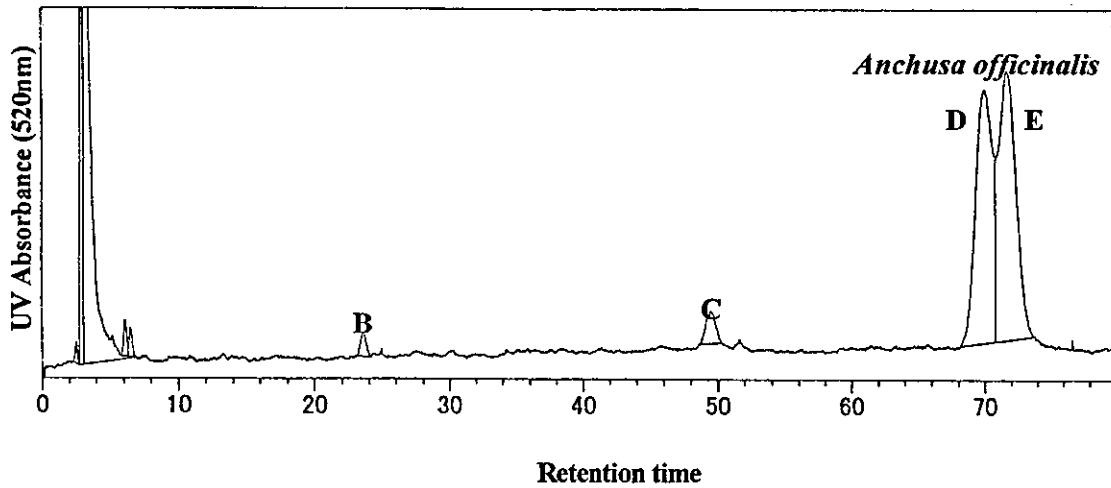


図3 *Anchusa officinalis* 及びアルカネット色素のクロマトグラム

Alkanet colour	T C G A A T C C T G C A T A G C A G A A C C A C T T G C G A A C A A S T T C T A	40
<i>Anchusa officinalis</i> C A A C	40
<i>Echium vulgare</i> C C . A A A C	40
Alkanet colour	A A - A A C G A A G G C G C C G G T C A G T G C A A G G A C T A C C T T G C C C	79
<i>Anchusa officinalis</i>	. . C . . A C . T . . . A T G . T G G . . C . T G G . . G A C A . A T	80
<i>Echium vulgare</i>	. . - . C . C G . A . A T C G G A - . . G T A .	78
Alkanet colour	T C G A T C G G A G C C C A A C G G T G C C A T A G G C A T A A T S T C G T T G C	119
<i>Anchusa officinalis</i>	. . T . G T . T - . . . T G . T C A T T . . C . T C G . T	119
<i>Echium vulgare</i> T . T C . . . T T . . . T A . . . T - T . G . .	117
Alkanet colour	G C T A A A C A A A C C C C C G G C G C G A G A A G C G C C A A G G A A T A C A	159
<i>Anchusa officinalis</i>	. . . C A T A G T	159
<i>Echium vulgare</i>	. . A . G T	157
Alkanet colour	T T - A A C G A G A G C T T G A A C C A T C C T C T C C C G T T C G C G G G G C	198
<i>Anchusa officinalis</i>	A A . . T . T C . T G A . A A A	198
<i>Echium vulgare</i>	. . T . . . A C . T A .	197
Alkanet colour	T T A G G G G A T C G G A G A C G G C T T C T T T A T A A A C C A C A A C G A C	238
<i>Anchusa officinalis</i>	C A T T . . A C	237
<i>Echium vulgare</i> C	237
Alkanet colour	T C T C G G C A A C G G A T A T C T C G G C T C T C	264
<i>Anchusa officinalis</i>	263
<i>Echium vulgare</i>	263

図4 アルカネット色素及びムラサキ科植物の ITS1 塩基配列

表1 アルカネット色素成分の存在比と鏡像異性体過剰率

	Crude	A	B	C	D	E
1) Content (%)	100	2.2	15.9	6.8	75.0	
2) Shikonin ee%	85.7	76.2	16.7	97.4	100	
1) x 2)	8570	168	266	660	7500	

表2 文献中に見られるアルカネットの基原種

Name	Specie	Reference
Picly alkanet	<i>Anchusa strigosa</i>	<i>J. Ethnopharmacol.</i> , 73 , 221-232 (2000) <i>ibid.</i> , 60 , 265-271 (1998)
Alkanet	<i>Alkanna tictoria</i>	<i>J. Ethnopharmacol.</i> , 72 , 191-205 (2000)
Alkanet	<i>Alkanna orientalis</i>	<i>J. Ethnopharmacol.</i> , 71 , 365-376 (2000)
Alkanet	<i>Alkanna tinctoria</i>	<i>Colourage</i> , 48 (5), 25-26 (2001)
Alkanet	<i>Alkanna tinctoria</i>	<i>Olaj, Szappan, Kozmetika</i> , 49 , 85-92 (2000)
Alkanet	<i>Alkanna tinctoria</i>	<i>Anal. Chem.</i> , 21 , 1352-1356 (1949)
Alkanet	<i>Anchusa tinctoria (Alkanna tinctoria)</i>	<i>J. Indian Chem. Soc.</i> , 17 , 272-276 (1940)

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 年度分担研究報告書
—既存添加物「ホウセンカ抽出物」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

既存添加物名簿記載「ホウセンカ抽出物」の規格作成に資することを目的として、同製品中に含有される化合物の成分検索並びに構造解析に関する基礎的研究を行い、新規ナフトキノン誘導体を含む数種の化合物単離し、それらの構造を明らかにした。

研究協力者

鄒 大鵬 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
川原信夫 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
室長

A. 研究目的

「ホウセンカ抽出物」は既存添加物名簿記載品目リストに「ツリフネソウ科ホウセンカ (*Impatiens balsamina* L.)の全草より室温時含水エタノールで抽出して得られたものである。」と記載されている(既存添加物名簿番号、409)。基原植物であるホウセンカ (*Impatiens balsamina* L.、英名 Garden balsam)はインド、マレー半島、中国南部原産で、今日では広く世界の庭園、花壇等で栽培される 1 年草である。全草及び種子が民間薬として風邪、魚肉中毒の治療に用いられるほか、腫れ物や外傷にも効果があるとされている。特に中国では本植物の種子を急性子(きゅうせいし)と呼称し、急性子は中華人民共和国薬典記載生薬である。食品添加物としての用途は酸化防止剤と記載されている。含有成分としてはナフトキノン類¹⁻⁴⁾、クマリン誘導体⁵⁻⁶⁾、フラボノイド配糖体⁷⁾、トリテルペン配糖体類

⁸⁻¹⁰⁾等 (Chart 1.及び 2.) が報告されているが、既存添加物名簿の「ホウセンカ抽出物」においては成分に関する記載が全くない。

本研究では、既存添加物「ホウセンカ抽出物」の規格作成に資することを目的として、市販「ホウセンカ抽出物」製品を入手し、成分に関する基礎的な研究を行ったので報告する。

B. 研究方法

試料及び試薬 市販「ホウセンカ抽出物」は日本食品添加物協会より入手した。オープンカラムの担体は、Kieselgel 60 (Merck 製)並びに Sephadex LH-20 (Pharmacia 製)を用いた。NMR 溶媒は Methanol-*d*4 99.8% (Isotec 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 分取 HPLC は島津製作所製 Shimadzu LC-8A system (ポンプ: LC-8A, 紫外可視検出器: SPD6AV, カラムオープン: TOSO RE8000) に、インテグレーターとして Shimadzu

CR-5A を接続したものを用いた。

NMR スペクトルは JEOL ECA-500 及び ECA-800 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)、Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC)及び 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。

また、単離した化合物の質量分析 (FAB-MS) は、MS700 (JEOL) に直接導入して測定した。FAB イオン化は positive または negative モード、マトリックスには *m*-nitrobenzyl alcohol または glycerol を用いた。

化合物の分画 「ホウセンカ抽出物」約 1900mL を約 500mL となるまで濃縮し、それぞれ室温でクロロホルム (1.5 L)、酢酸エチル (1.5 L)、1-ブタノール (1.5 L) で順次抽出を行った。各分画を濃縮、乾固し、クロロホルム分画(1.4 g)、酢酸エチル分画(23.7 g)、1-ブタノール分画(2.0 g) 及び水層 (86.2 g) を得た (Chart 3.)。クロロホルム分画 (1.4 g) はシリカゲルクロマト (ヘキサン : 酢酸エチル) で分離を行い、5 : 1 の溶出分画 (8.8 mg) より化合物 1 (5.6 mg) が結晶として分離され、さらに 5 : 1 及び 3 : 1 の溶出分画より化合物 2 (12.0 mg) を得た (Chart 3.)。また 1 : 1 の溶出分画 (23.2 mg) を分取 HPLC [カラム, C18 SG120 (20 mm i. d. x 250 mm.); 移動相, 5% メタノール; 流速, 5 mL/min] 及び Sephadex LH-20 (クロロホルム : メタノール = 1:1) で分離を行い、化合物 3 (3.1 mg) を得た (Chart 3.)。一方、酢酸エチル分画 (20.0 g) はシリカゲルクロマト (クロロホルム : メタノール) で分離を行い、10 : 1 の溶出分画 (57.9 mg)

をさらに分取 HPLC [カラム, C18 SG120 (20 mm i. d. x 250 mm.); 移動相, 15% メタノール; 流速, 5 mL/min] で分離を行い、化合物 4 (0.8 mg) 及び 5 (1.3 mg) を得た (Chart 4.)。

C. 研究結果

化合物 1 は negative FABMS より MW 471 (M-H) が得られ、¹H NMR スペクトルにおいてδ 5.29 (1H, br. t) よりオレフィンプロトン、δ 1.37 (3H, s), 0.97 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.79 (3H, s) 及び 0.77 (3H, s) より 7 個のメチル基の存在が示唆された。また ¹³C NMR より 1 組のオレフィンカーボン及び 1 個のカルボニルカーボンを含む 30 本のシグナルが観測され、DEPT スペクトルより 7 個のメチル基、9 個のメチレン、5 個のメチン及び 6 個の 4 級炭素の存在が明らかとなった。5 個のメチンのうち 2 個 (δ 75.3 及び 79.7) はその化学シフトから酸素原子が結合していることが推測された。これらのデータより 1 は、1 組のオレフィンカーボン、1 個のカルボン酸及び 2 個の水酸基を有する oleanan 型トリテルペノイド誘導体と考えられた。さらに HMQC 及び HMBC スペクトル解析並びに文献検索の結果、化合物 1 は *Echinocystis* spp. 及び *Aibzzia* spp. より単離、構造決定された echinocystic acid¹¹⁾ と同定された。1 は本植物から初めての単離報告である。化合物 2 は ¹H 及び ¹³C NMR スペクトル解析よりメトキシ基及びアルデヒド基を有する 1, 2, 4 置換ベンゼン環の存在が示唆され、そのケミカルシフト並びに標品との直接比較により vanillin と同定された。化合物 3 は TLC 上で強い蛍光を示し、¹H 及び ¹³C NMR スペクトル解析よりメトキシ基及び水酸基を有するクマリン系化合物と推測された。本化合物は最終的に標品との直接比較により scopoletin と同定された。化合物 4 は ¹H

及び ^{13}C NMR スペクトル解析よりアルデヒド基を有する 1,4 置換ベンゼン環の存在が示唆され、そのケミカルシフト並びに標品との直接比較により 4-hydroxybenzaldehyde と同定された。化合物 **5** は positive FABMS より MW 179 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ が得られ、HR FABMS より分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ と決定された。 ^1H NMR スペクトルにおいて δ 7.44 (1H, t, $J=7.8$ Hz), 7.67 (1H, dt, $J=2.3, 7.8$ Hz), 7.69 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 7.93 (1H, d, $J=7.8$ Hz) より 1,2 置換ベンゼン環の存在が示唆された。さらに H-H COSY 及び HMQC スペクトルから -CH₂-CH(OH)-CH(OH)- の部分構造の存在が明らかとなり、HMBC スペクトルの解析 (Fig. 1) より **5** は 2 個の水酸基を有するジヒドロナフトレン誘導体と決定された。3,4 位の立体配置に関してはプロトンの結合定数 ($J=12.0$ Hz) より、trans-diaxial であることが明らかとなった。なお、本化合物は文献未記載の新規化合物と考えられた。

D. 考察

「ホウセンカ抽出物」は既存添加物名簿収載品目リストに「ツリフネソウ科ホウセンカ (*Impatiens balsamina* L.) の全草より室温時含水エタノールで抽出して得られたものである。現在までの研究において本植物の二次代謝産物として、Chart. 1 及び 2 に示すようなナフトキノン誘導体、トリテルペノイド配糖体類の存在が報告されている。本研究の結果、「ホウセンカ抽出物」に含有される化合物は、既に本植物より報告されている化合物群とは若干異なる比較的単純な低分子化合物群並びに基本骨格の異なるトリテルペノイドであることが明らかとなった。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ため、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。

また現在、他の分画の含有成分に関しても化合物の単離精製、構造解析を進行中である。

E. 結論

既存添加物名簿収載品目「ホウセンカ抽出物」製品に含まれる化合物として、echinocystic acid、vanillin、scopoletin、4-hydroxybenzaldehyde が含有されることを明らかとするとともに、新規ジヒドロナフトキノン誘導体を単離、構造決定した。

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

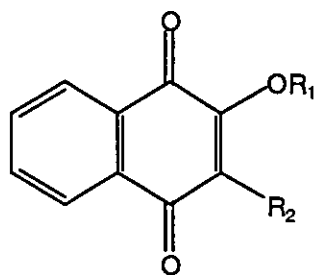
H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

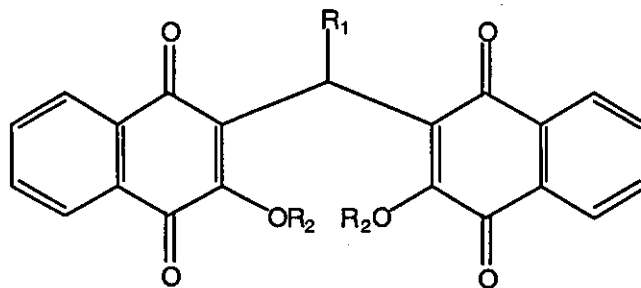
参考文献

1. Oku, H. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 658-660 (2002)
2. Oku, H. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 137-139 (2002)
3. Ishiguro, K. *et al.* *J. Nat. Prod.* **61**, 1126-1129 (1998)
4. Panichayupakaranant, P. *et al.* *Phytochemistry* **40**,

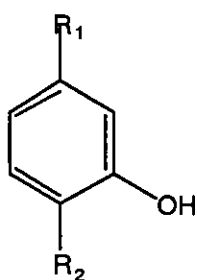
- 1141 (1995)
5. Afzal, M. *et al.* *Heterocycles*, **22**, 813 (1984)
6. Panichayupakaranant, P. *et al.* *Planta Med.* **64**, 775 (1998)
7. Sosa, F. *et al.*, *Phytochemistry* **9**, 441-446 (1970)
8. Shoji, N. *et al.*, *Tetrahedron* **50**, 4973-4986 (1994)
9. Shoji, N. *et al.*, *Phytochemistry* **37**, 1437-1441 (1994)
10. Shoji, N. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 1422-1426 (1994)
11. Okada, Y. *et al.*, *Phytochemistry* **26**, 2789-2796 (1987)



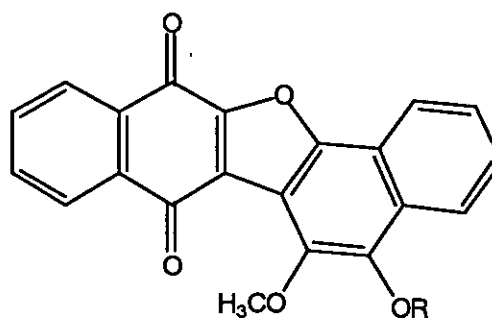
$R_1 = H, R_2 = H$
 $R_1 = CH_3, R_2 = CH_2CH_2OH$
 $R_1 = Na, R_2 = CH_2CH_2OH$
 $R_1 = CH_3, R_2 = OCH_3$



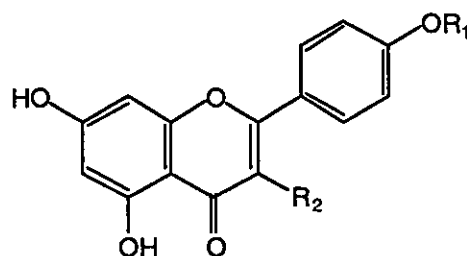
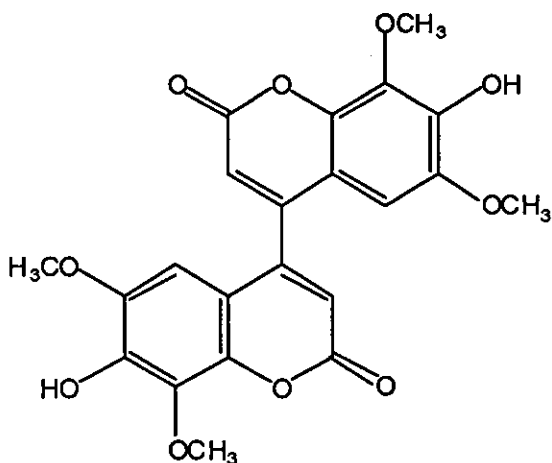
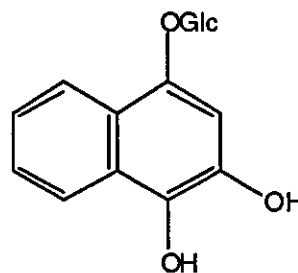
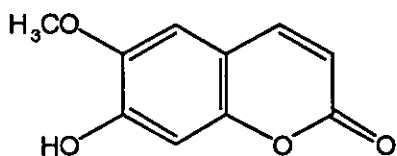
$R_1 = CH_3, R_2 = H$
 $R_1 = CH_3, R_2 = Na$
 $R_1 = H, R_2 = H$



$R_1 = COOH, R_2 = H$
 $R_1 = CH=CHCOOH, R_2 = H$
 $R_1 = CH=CHCOOH, R_2 = OCH_3$



$R = H$
 $R = Glc$



$R_1 = H, R_2 = OGlc-Rha$
 $R = Glc-Xyl, R_2 = H$

Chart 1 Known compounds isolated from *Impatiens balsamina* (1)