

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性確保推進研究事業）  
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  
コメヌカ酵素分解物の品質に関する研究

分担研究者 永津 明人 名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師

研究要旨 コメヌカ酵素分解物の主活性成分とされてるフィチン酸の定性・定量を<sup>31</sup>P-NMR スペクトルを用いる方法で確立した。提供されたコメヌカ酵素分解物に含まれるフィチン酸は 11.1%と算出された。

### A. 研究目的

食品添加物「コメヌカ酵素分解物」はフィチン酸 (Figure 1) を主活性成分とするものとされているがその品質規格は定まっておらず、定性定量方法も確立されていない。今回は規格作成とその後の検査のための定性定量の方法の確立を目的とする。

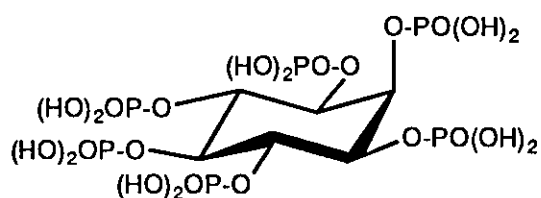


Figure 1 Phitic acid

### B. 研究方法

標品が存在する場合の定性試験は TLC を用いて、定量は定性試験も兼ねて HPLC を用いることが一般的である。「コメヌカ酵素分解物」の主活性成分であるフィチン酸は標品も存在し、分析に用いる HPLC 条件も文献に存在はしているが、HPLC 分析では分離能が悪いという欠点がある。近年、イオンクロマト・電気伝導度検出器という組み合わせを用いる方法も報告され、フィチン酸と共にイノシトール

ルのモノ ペンタリン酸エステル類の定量を試みているが、まだ発展途上のようなものである。

今回、我々は NMR 装置の利用を考えた。さらに、大量に共存するとされているペプチドを排除しフィチン酸のみを検出・定量する方法として <sup>31</sup>P 核の測定を考えた。フィチン酸はイノシトールのヘキサリン酸エステルであるため、酵素反応中の緩衝液のリン酸塩が存在する可能性がある以外、フィチン酸由来以外のリン原子が存在する可能性は極めて低いと考えられる。以上の理由から、まず、マスマスペクトルによりフィチン酸以外のイノシトールリン酸エステル類の存在の有無を確認した後、<sup>31</sup>P-NMR を用いた定性定量法の確立を行うことにした。

### C. 研究結果

まず、部分的にリン酸エステルが加水分解された化合物も存在する可能性があるため、念のため ESI-FT-ICR-MS を用いてそれらの存在を確認した。その結果、フィチン酸のピーク (661 [M+H]<sup>+</sup>) は確認できたもののリン酸エステルが加水分解された化

合物に相当する 581, 501, 421, 341, 261 などのピークは確認されなかったことから、リン酸エステル類はフィチン酸のみと考えていいということがわかった。

実際に NMR 測定に入るに当たって、標品となる市販のフィチン酸を水に溶解して  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトル測定を行ったところ、非常にブロードなシグナルとなった。フィチン酸は 12 個の酸であることから解離状態が一定でないためブロードになったと判断、アルカリ性側か酸性側に解離状態を固定する必要があるが、アルカリ側ではリン酸エステルが加水分解される可能性がより高いため、酸性側にすることとし、全てのリン酸部が  $-\text{OPO}(\text{OH})_2$  となったフィチン酸の pH が 0.86 であることから、強酸として塩酸を用いることとした。4%の塩酸溶液中でフィチン酸を測定したところ、十分な分解能が得られた。

定量に当たっては内部標準を用いることとした。 $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトル測定の内部標準にはリン酸を用いることが多い。そこで、リン酸を用いたところ、フィチン酸のシグナルと重なってしまった。P-O 結合を持ち電子的な環境がよく似ているためと考え、P-O 結合を持たない市販の水溶性化合物として HMPT (*N,N'*-hexamethylphosphotriamide) を用いたところ、HMPT のシグナルは大きく低磁場にずれた共鳴位置に観測された。この状態で 3 時間放置後再び測定を行ってもシグナルに変化はなかった。3 日後にも同じサンプルを測定したところ、フィチン酸のシグナルに変化はなかったが、HMPT のシグナルは消失していた。フィチン酸は強酸条件下でもこの程度の時間であれば安定に存在することが確認できたが、HMPT は加水分解されたと考えられることから、

内部標準の HMPT はなるべく測定の直前に加える必要があることがわかった。

次に、コメヌカ酵素分解物の測定を行った。4%塩酸溶液中で測定したところ、シグナルは非常にブロードなままであった。これは、大量に混在するとされる「ペプチド」が buffer 作用を示すためと考えられた。そこで、タンパクの除去などで常用される EtOH 沈殿を行い、「ペプチド」の除去を試みた。すなわち、コメヌカ酵素分解物を水に溶解後、EtOH を 60-80% になるように加えて遠沈し、その上清をとって 5-10% になるように塩酸を加える、または一旦乾固した後、希塩酸に再溶解するといった操作を行い、スペクトル測定を行った。その結果、シグナルはある程度シャープになるもののその積分値が小さくなること、さらに 80% EtOH で沈殿させた際には、リン酸のシグナルのみになり、ある程度の塩になっているフィチン酸は含水 EtOH に溶解しないことが判明、同時に混合物としてリン酸が含有されていることも判明した。

そこで、コメヌカ酵素分解物を直接塩酸に溶解する方法に戻った。溶解する塩酸の濃度をあげて測定を行い、最終的にコメヌカ酵素分解物を測定で妥協できる量まで減らして濃塩酸に溶解することで、満足とは言えないもののフィチン酸由来のシグナルという判断が可能な状態とすることができた。

(Figure 2C) また、濃塩酸中ではフィチン酸とリン酸のシグナルとを充分に分離できることも判明した。

(Figure 2A, B)

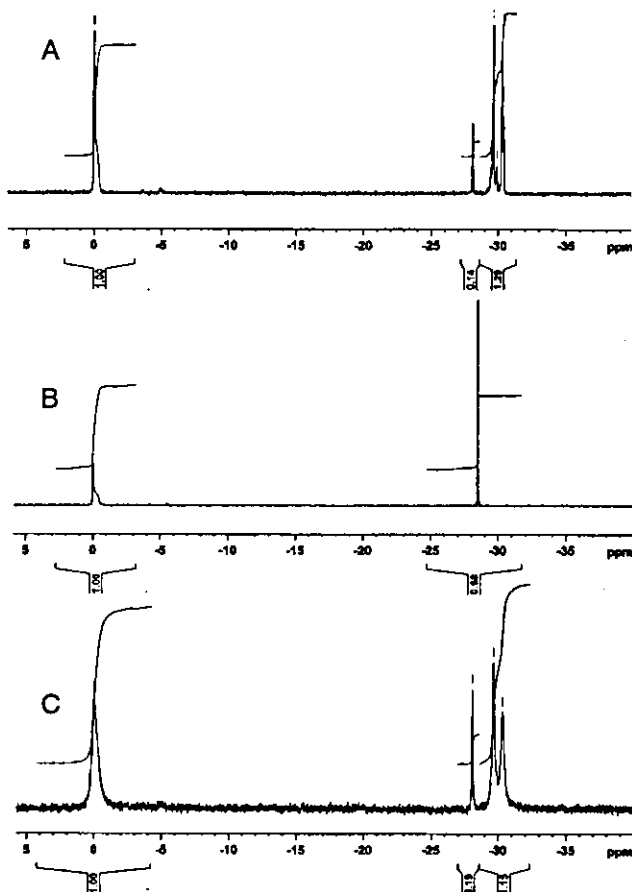


Figure 2 フィチン酸(A)、リン酸(B)、コメヌカ酵素分解物(C)の各濃塩酸溶液の<sup>31</sup>P-NMR スペクトル

一方、標品のフィチン酸であるが、試薬純度の高いNa塩(95%)は濃塩酸に3 mg/mL程度しか溶解しない。そこで市販の約50%フィチン酸水溶液を用いて検量線を作成することにした。この約50%フィチン酸水溶液試薬の濃度は、Na塩(95%)の試薬を用い、おのおの希塩酸に溶解して積分値を比較することで、50%であると確定した。(Figure 3A, B)

50%フィチン酸水溶液 30 mg/mL 溶液を順次希釈し、フィチン酸(C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>)として 1.63, 3.25, 7.50 mg/mL の濃塩酸溶液を作成した。内部標準用にはNMRのlock用も兼ねて重水に溶解したHMPTの

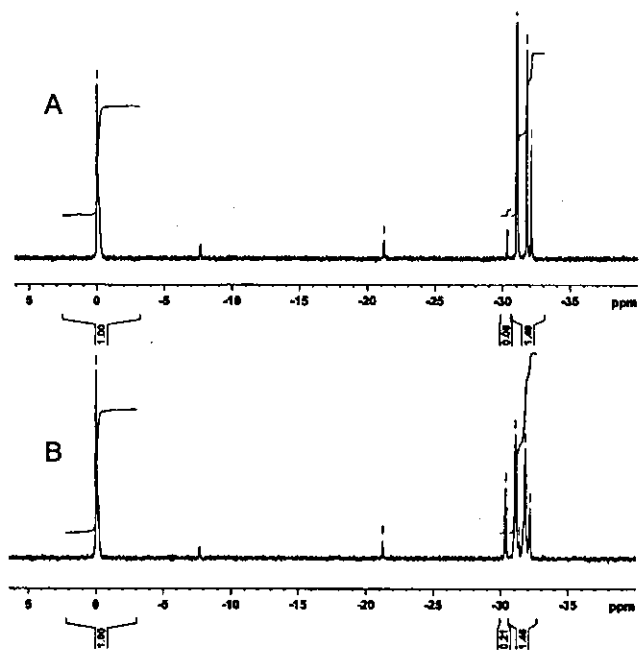


Figure 3 標品に用いたフィチン酸の各18%塩酸溶液の<sup>31</sup>P-NMR スペクトル

95%フィチン酸 12Na 塩 (Sigma)より調製した溶液 (A)および 50%フィチン酸水溶液 (nacalai tesque)より調製した溶液 (B)

60 mg/mLを準備した。フィチン酸濃塩酸溶液 450 μL と内部標準用のHMPT重水溶液 50 μL を外径 5 mm のNMR測定管に入れて混合し、観測幅 38759 Hz、ポイント数 16 K、積算 720 回 (測定時間 27 分)、室温という条件で測定を行い、得られたデータの内部標準のシグナルの積分値を1としたときのフィチン酸シグナルの積分値から検量線を作成した。

$$\text{フィチン酸量} = 2.91 \times \text{積分値}$$

という結果が得られた。

次に、コメヌカ酵素分解物 30 mg/mL の濃塩酸溶液を同条件で測定し、検量線から濃度を計算したと

ころ 3.32 mg/mL と算出された。

以上のように今回提供のあったコメヌカ酵素分解物中のフィチン酸は 11.1% であるとわかった。

#### D. 考察

以上のように非常に簡便な方法で、定量ができることを立証した。NMR 装置を使用し、且つ余り一般にはなじみの少ない  $^{31}\text{P}$  核の測定ということで汎用性に関して問題視される可能性はあるが、NMR 装置は都道府県の衛生研究所にこそ配置されていることはほとんどないものの、理系学部のある大学および高等専門学校にはほとんど配置されており、特に近年配置されていた機種はほとんど多核測定に対応している。国産メーカーの製品に限ってみても  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトル測定のできない都道府県は無いため、汎用性の点では問題はないと考える。

コメヌカ酵素分解物のスペクトルの分解能が定性的確認に完全に満足できるものではないといえる。今回は測定時間1検体30分以内を目標にしてサンプル濃度を決めたが、サンプル濃度を小さくし (= buffer 作用を示すペプチドの量を減らし)、積算回数を増やすことで、測定時間は延びるもののシグナルの分解能は向上し、この場合は定性的確認に耐えるものと考え。また、オートサンプラーを用いて測定する場合、内部標準と混合した状態でサンプルを放置する時間が長くなるので、HMPT よりも酸に対して安定な内部標準の化合物に変えるなどの若干の改良は必要と思われる。

しかしながら、塩酸を使用するが非接触的な測定なので機器への影響もなく、 $^1\text{H}$  核の測定など他の 1

次元 NMR 測定と全く同じ操作であり、他のルーチンの測定業務に挟んでの測定も可能なので、能率的な定量手段が確立できたと考える。

#### E. 結論

コメヌカ酵素分解物中のフィチン酸含有量を  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトル測定で定量する方法を確立した。今回提供のあったコメヌカ酵素分解物中のフィチン酸は 11.2% であるとわかった。

#### 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

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  
精油除去ウイキョウに含有される成分に関する研究

分担研究者 永津 明人 名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師

研究要旨 精油除去ウイキョウの成分の確認を行い、大量の賦形剤中、主活性成分として既存添加物名簿記載の $\alpha$ 体ではなく 4-O- $\beta$ -D-gulucosylsynapylalcohol が 0.25% 存在することおよび adenosine が含有されることがわかった。

A. 研究目的

食品添加物「精油除去ウイキョウ」は 4-O- $\alpha$ -D-gulucosylsynapylalcohol (Figure 1) を主活性成分とするものとされているがその品質規格は定まっておらず、定性定量方法も確立されていない。今回は規格作成とその後の検査のために、確かに含有されていることの確認と定量方法の確立を目的とした。

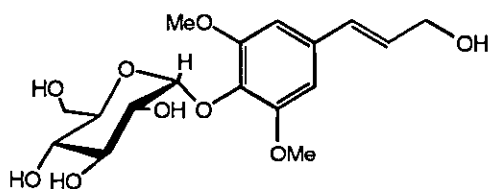


Figure 1 4-O- $\alpha$ -D-gulucosylsynapylalcohol

B. 研究方法

「精油除去ウイキョウ」から主活性成分 4-O- $\alpha$ -D-gulucosylsynapylalcohol であると思われる化合物をまず単離して、その構造と存在を確認するとともに、単離した同化合物の定量を行うことにした。また、合わせて単離される化合物があれば、それらを単離構造決定することとした。

C. 研究結果

「精油除去ウイキョウ」には大量の賦形剤が含まれていることから、その TLC を展開すると、原点付近に濃いスポットが確認されるものの、ある程度展開されて UV 吸収を持つ化合物のスポットはごくわずかに確認できるにすぎない状態であった。(Figure 2)そこで、極めて極性が高いと考えられる大量の賦形剤の除去から開始し、Figure 3 に示したように分画を行った。

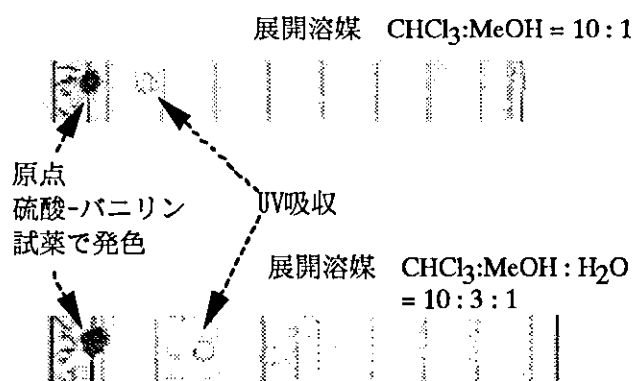


Figure 2 「精油除去ウイキョウ抽出物」のシリカゲル TLC 模式図

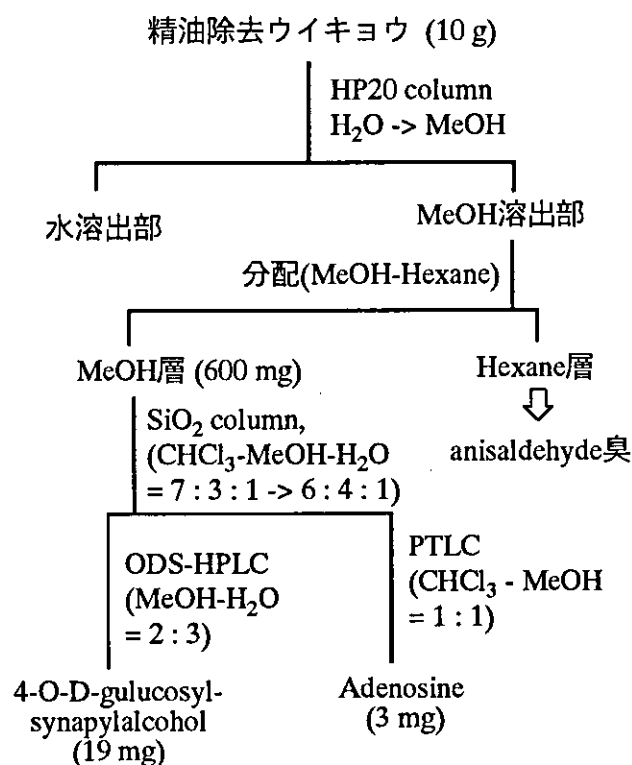


Figure 3 精油除去ウイキョウからの化合物の単離

「精油除去ウイキョウ」10 g を水に懸濁し、HP20 カラムに吸着させ、カラムを水 700 mL で溶出した。その後溶媒を MeOH に切り替えて 400 mL を用いて溶出し、水溶出部と MeOH 溶出部とに分けた。MeOH 溶出部には若干の沈殿が生じたので、それらも濾去し濾液を得た。この濾液はウイキョウ特有のアニスアルデヒドに似た芳香を持っていたことから、濾液を hexane 抽出した。芳香は hexane 画分に移動した。分配時の MeOH 層を乾固した後、シリカゲルカラムクロマトで分離し数画分に分け、4-O- $\alpha$ -D-gluco-syl-synapylalcohol と思われる画分をさらに逆相 HPLC (ODS, MeOH-H<sub>2</sub>O = 2:3) を用いて精製したところ、当該化合物を 19 mg 得た。この化合物は、ESI-FT-ICR-MS スペクトルにおいて擬分子

イオンピーク 395.1338 (C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>, calcd. 395.1313) が観測されたことから分子式を C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub> と特定できた。<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルおよび二次元 NMR スペクトルの測定の結果、この化合物は糖部分とシナピルアルコール部分とからなること、糖は HMBC 相関からフェノール性水酸基上に置換していることが明らかとなった。糖の種類は、<sup>13</sup>C-NMR における化学シフトからグルコースと考えることができ、アノマー位の炭素の化学シフト値 ( $\delta_c$  105.4) とプロトンのカップリング定数 (7.6 Hz) から、グルコースは  $\alpha$  ではなく  $\beta$  と結論することができた。よって、この化合物を 4-O- $\beta$ -D-gluco-syl-synapylalcohol と決定した。(Figure 4, Table 1)

Hexane 画分については、乾固後、NMR 測定を行ったが、特異臭関連化合物が明らかになるようなシグナルは観測されなかった。一方、シリカゲルカラム分離時の他の画分にも検討を行ったところ、UV 吸収を持つ化合物として adenosine を 3 mg 単離した。この構造も二次元 NMR スペクトルの測定、および標品との <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの比較を行い、一致したことから構造を決定した。(Figure 5)

次に、4-O- $\beta$ -D-gluco-syl-synapylalcohol の定量を行った。カラム: Nucleosil 5C18, 4.6 mm i.d. x 250 mm、溶媒: MeOH-H<sub>2</sub>O = 10:90  $\rightarrow$  50:50 へのグラジエント、流速: 1.0 mL/min、inject: 10  $\mu$ L、検出: UV 260 nm という条件で 4-O- $\beta$ -D-gluco-syl-synapylalcohol の 0.001, 0.0025, 0.0050, 0.010, 0.025, 0.050, 0.10 mg/mL の各 75% MeOH 溶液を用いて検量線を作成した。その結果

$$\text{濃度 (mg/mL)} = 6.0 \times 10^8 \times \text{ピーク面積}$$

という関係が明らかとなった。

次に同条件で精油除去ウイキョウ 10 mg/mL 溶液を用いて定量を行った。その結果この溶液には 4-O-β-D-galucosylsynapylalcohol が 0.025 mg/mL 含有されていることが明らかとなった。(Figure 6)

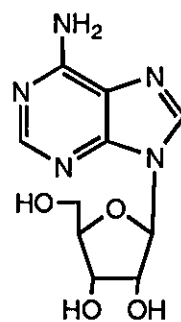


Figure 5 Adenosine

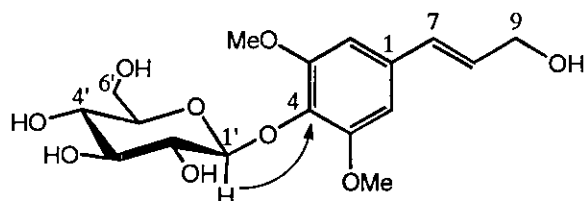


Figure 4 4-O-β-D-galucosylsynapylalcohol  
H→CはアノマープロトンからのHMBC相関

Table 1 4-O-β-D-galucosylsynapylalcohol の <sup>1</sup>H-,  
<sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータ (in CDCl<sub>3</sub>)

Pos.	δ <sub>C</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm), J(Hz)
1	135.3	
2,6	105.5	6.75, s
3,5	154.4	
4	135.9	
7	131.3	6.54, d, 15.9
8	130.1	6.32, dd, 15.9, 5.8, 5.5
9	63.6	4.22, dd, 5.6, 1.5, 1.2
1'	105.4	4.87, d, 7.6
2'	75.8	3.48, dd, 9.5, 7.6
3'	77.9	3.41, m
4'	71.3	3.41, m
5'	78.4	3.21, ddd, 9.5, 5.2, 2.4
6'	62.6	3.66, dd, 11.9, 5.2 3.78, 11.9, 2.4
3, 5-OMe	57.1	3.85, s

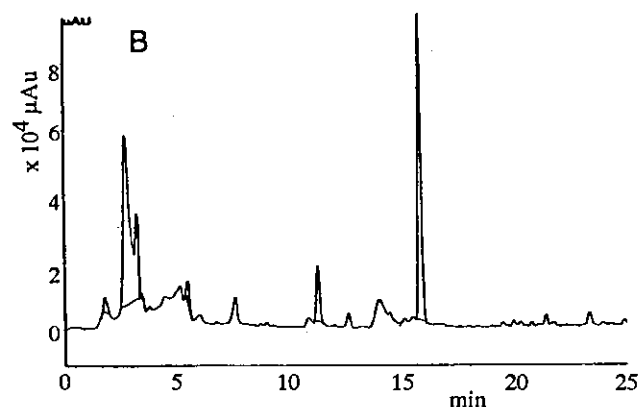
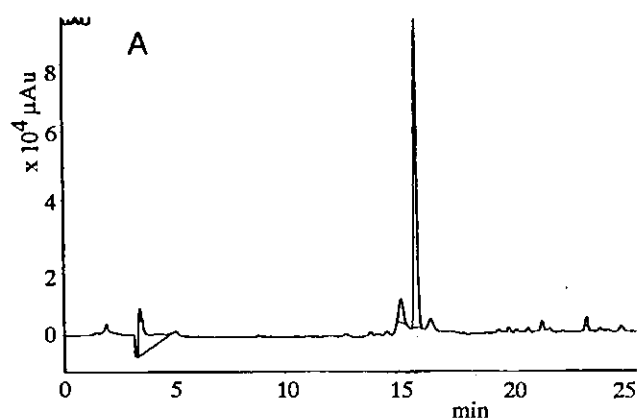


Figure 6 4-O-β-D-galucosylsynapylalcohol (A)と「精油除去ウイキョウ」(B)のHPLCクロマトグラム

#### D. 考察

シナピルアルコール誘導体として 4-O-D-galucosylsynapylalcohol は単離されたものの、その構造は既存添加物名簿に掲載されているαでは

なく 4-O-β-D-galucosylsynapylalcohol という結果になった。しかも、「精油除去ウイキョウ」中の含有量は 0.25% という極めて少ない量であった。α体とβ体とは化合物の極性などの化学的性質が極端に異なることは無いことから、混在すればクロマト上で極めて近くにピークが現れるはずである。しかし、HPLC クラマトグラム上ではβ体の近傍に大きなピークは無い。また NMR スペクトルも極めて純度の高いβ体であることを示しており、HPLC の同一ピークに両者が混在していると考えすることは困難である。よって、α体は存在するとしても極めて微量であり、4-O-D-galucosylsynapylalcohol を主活性成分とするのであればβ体を主活性成分とすべきであると考えられる。

#### E. 結論

精油除去ウイキョウの成分の確認を行ったところ、大量の賦形剤中、主活性成分として含有されているものは既存添加物名簿に記載のα体ではなく 4-O-β-D-galucosylsynapylalcohol であることを確認することができ、HPLC を用いて定量を行うことで「精油除去ウイキョウ」中には 0.25% というごく少量が含有されていることがわかった。また、adenosine も比較的多い含有量で含有されることがわかった。

#### 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



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「アマシードガム」に含まれる多糖体に関する研究

分担研究者 李 貞範 富山医科薬科大学 助手

研究要旨 既存添加物「アマシードガム」には中性多糖および分子量の異なる数種の酸性多糖が含まれていた。その構成糖およびそれらの結合様式を検討したところ、中性多糖はキシランタイプの多糖、酸性多糖はラムノガラクトツロナンタイプの多糖であることが明らかになった。

#### A. 研究目的

既存添加物「アマシードガム」は、既存添加物収載品目リストに「アマ科アマ (*Linum usitatissimum* L.) の種子の胚乳部分より、室温時温時水又は含水アルコールで抽出して得られたものである。主成分は多糖である」と記載されている。しかしながら、その多糖類の特徴に関する情報は乏しいことから、多糖類成分に関して検討を実施した。

#### B. 研究方法

試料および試薬 日本添加物協会を通じて入手した増粘安定剤アマシードガム製品を用いた。試薬はすべて特級品を用いた。

アマシードガム製品の分画 アマシードガム製品 (2 g) を蒸留水 (300 ml) に溶解し、10%塩化セチルピリジニウム (CPC) 溶液を沈殿が十分に生じるまで加えた。生じた沈殿と上清を遠心分離により分離した。上清部は3倍量の EtOH を加え 4°C で一晩静置し、生じた沈殿を遠心分離によって得た。この沈殿を再度蒸留水に溶解後3倍量の EtOH を加え 4°C で一晩静置した。遠心分離によって沈殿を得た後、蒸留水に溶解後凍結乾燥し、中性多糖画分を得た。(収量 0.26 g, 収率 13%) 一方、CPC 沈殿部は 1 M NaCl にて溶解し、ここに3倍量の EtOH を

加え 4°C で一晩静置し、多糖体を沈殿させた。同様の操作を2回繰り返し得られた沈殿を蒸留水に溶解後、凍結乾燥し、酸性多糖画分を得た(収量 1.24 g, 収率 62%)。

酸性多糖画分のゲルろ過による分画 酸性多糖画分 (50 mg) を蒸留水 (10 ml) に溶解し、Toyopearl HW-65(S) ゲルろ過クロマトグラフィー (2.2×100 cm) に供した。溶出は 0.2 M NaCl、流速 0.5 ml/min で行い、5 ml ずつフラクションを得た。フェノール硫酸法により生じた呈色をもとに溶出曲線を作製した。収量: A1 (6.1 mg, 収率 7.6%)、A2 (16.3 mg, 収率 20.2%)、A3 (15.4 mg, 収率 19.1%)

構成糖の分析 構成糖の分析は以下の方法で行った。試料 1 mg に MeOH (1 ml) と塩化アセチル (70 μl) を加え、80°C で 16 時間メタノリシスを行った。反応液を窒素気流下で乾固後、再度少量の MeOH を加え乾固させる操作を2回実施した。ここにシリル化試薬 (TMSI-H, GL-Science) を加え、60°C で 1 時間反応させた。窒素気流下で乾固後ヘキサン (1 ml) に溶解し、GC-MS (島津製作所 GC/MS QP-5000) で分析した。GC-MS 条件: カラム J&W DB-1MS (30 m×0.32 mm)、カラム温度: 110-260°C (5°C/min), 260-300°C (20°C/min)、検出: MS

**メチル化分析** メチル化多糖は箱守法に従い調製した。すなわち、乾燥した試料 1 mg を DMSO (0.5 ml) に溶解し、2 時間攪拌した。ここに 2 M  $\text{CH}_3\text{SOCH}_2\text{Na}^+$  (0.5 ml) を加え、5 時間攪拌した。反応液をアイスバス上で凍結後、 $\text{CHI}_3$  (0.25 ml) を加え一晩反応させた。窒素気流により過剰の  $\text{CHI}_3$  を除去後、アイスバス上で蒸留水で 2 倍希釈した。この反応液を SepPak C18 固相カートリッジに供し、メチル化多糖を精製した。溶出は蒸留水 (8 ml) , 15%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (8 ml) で順次行い、次いで  $\text{CH}_3\text{CN}$  (2 ml) と  $\text{EtOH}$  (2 ml) で溶出する画分を回収した。酸性多糖画分については、THF (0.4 ml) に溶解し、 $\text{LiBH}_4$  (5 mg) を加え、70°C で 1 時間処理した。。反応液は 10%  $\text{AcOH}/\text{MeOH}$  を加えることで反応を停止し、乾固後  $\text{CHCl}_3$  と水で分配することで還元メチル化多糖を得た。メチル化多糖を 2 M TFA (0.3 ml) に溶解し、120 °C で 3 時間加水分解した。部分メチル化単糖を  $\text{NaBD}_4$  で還元後、アセチル化し部分メチル化アルジトールアセテートを得た。これを GC-MS にて分析した。GC-MS 条件：カラム J&W DB-1MS (30 m × 0.32 mm)、カラム温度 (100°C-250°C, 2°C/min)、検出：MS

各ピークの同定は 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl glucitol ( $R_t=28.175$  min) との相対保持時間および MS フラグメンテーションパターンとの比較により行った。

**見かけの分子量の測定** 多糖類の見かけの分子量は島津 LC-10 HPLC にて、TSK-gel GMPW<sub>XL</sub> カラム (7.6 × 300 mm × 2) を用い、溶離液は 0.2 M NaCl、流速 0.5 ml/min の条件で、RI 検出により行った。検量線は分子量既知のプルランを用いて作製した。

### C. 研究結果

塩化セチルピリジニウムを用いた分画法を適用することにより、中性多糖画分 (0.26 g) と酸性多糖画分 (1.24 g) を得た。中性多糖画分は GPC 分析で

シングルピークとして溶出したことから、これ以上の精製操作は行わなかった。一方、酸性多糖画分は 2 つのピークが観測された (Fig. 1)。さらにゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより分画し、A1、A2、A3 画分を得た (Fig. 2)。

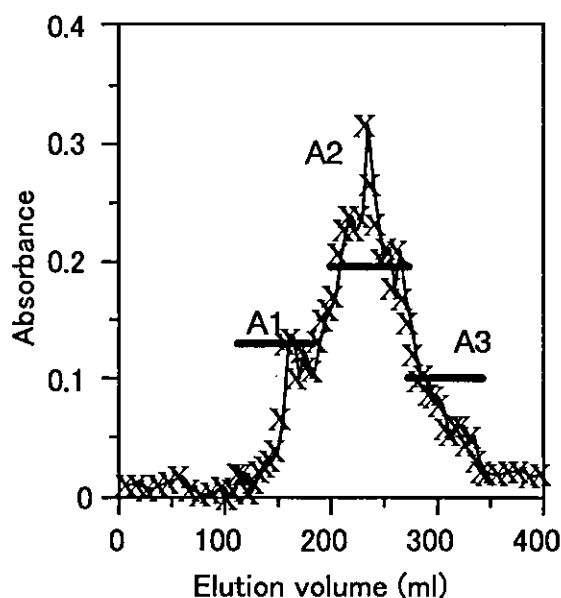


Fig 2 Elution Profile of Acidic Polysaccharide Fraction of Amaseed Gum.

ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画したそれぞれの画分について見かけの分子量を測定したところ、N, A1, A2, および A3 の前に溶出したピークは最も大きい分子量マーカー ( $8.53 \times 10^5$ ) よりも早く溶出したことから、見かけの分子量はそれ以上であることが分かった。A3 の後ろに出たピークについては  $5.28 \times 10^5$  と算出された (Fig. 1)。

以上の HPLC 分析より A3 画分については分子量的にも異なる多糖の混在が認められたが、化学的特徴を推定することを目的に、それぞれの画分の単糖組成を検討したところ、Table 1 に示す様な結果を得た。

Table 1. Sugar Compositions of Each Fraction

	N	A1	A2	A3
Ara	13.0%	1.6%	1.2%	n.d.
Xyl	66.2%	17.2%	11.2%	10.7%
Rha	13.0%	32.4%	35.3%	36.8%
Fuc	n.d.	3.2%	3.5%	2.1%
Gal	3.6%	18.5%	14.2%	11.0%
Glc	0.7%	4.6%	0.8%	1.9%
Man	n.d.	2.6%	8.1%	6.1%
GalA	3.5%	19.7%	25.7%	31.4%

n.d.: not detected

これらの結果より、N画分はキシランタイプの多糖であること、一方A1—A3画分はラムノガラクトロナンタイプの多糖であることが予想された。

以上の結果をふまえて、次に構成糖の結合様式をメチル化分析により検討した (Fig. 3, 4, and Table 2)。その結果、いずれの画分も主に Rha 残基で枝分かれ構造を取る多分岐の多糖体であることが分かった。酸性多糖体はラムノガラクトロナンタイプの多糖体であり、GalA 残基は全て 1,4-結合をしていることが分かった。

Table 2. Methylation Analyzes of Each Fraction.

	N	A1	A2	A3
t-Xyl	10.6	3.0	0.6	1.2
1,3-Xyl	2.5	1.3	n.d.	n.d.
1,4-Xyl	18.8	2.2	0.4	n.d.
1,2,3,4-Xyl	8.9	n.d.	n.d.	n.d.
1,5-Araf	7.2	1.4	n.d.	n.d.
t-Rha	2.0	3.0	0.6	1.2
1,2-Rha	11.8	3.7	11.3	26.4
1,2,3-Rha	22.6	37.4	31.9	24.6
t-Gal	15.4	30.3	19.8	19.1
1,4-GalA	n.d.	16.0	31.6	23.4

Each value was represented as mol%.

n.d.: not detected

#### D. 考察

アマシードガムは増粘安定剤として用いられることから、その粘性は極めて高かった。しかしながら、4級アンモニウム塩 (塩化セチルピリジニウムクロライド) を用いることで、中性多糖画分と酸性多糖画分に分画することが出来た。酸性多糖画分は GFC で複数のピークが観察されたことから、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画を実施したが、その溶液の粘性が極めて高かったことから十分な分離を達成できなかった。しかしながら、各種分析によりアマシードガム中には広い意味でのキシランタイプの多糖とラムノガラクトロナンタイプの多糖が混在していることが推測された。

#### E. 結論

今回、提供を受けたアマシードガムにはキシロースを主要構成単糖とする中性多糖と数種のラムノガラクトロナンタイプの酸性多糖が含まれることが推測された。

#### 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

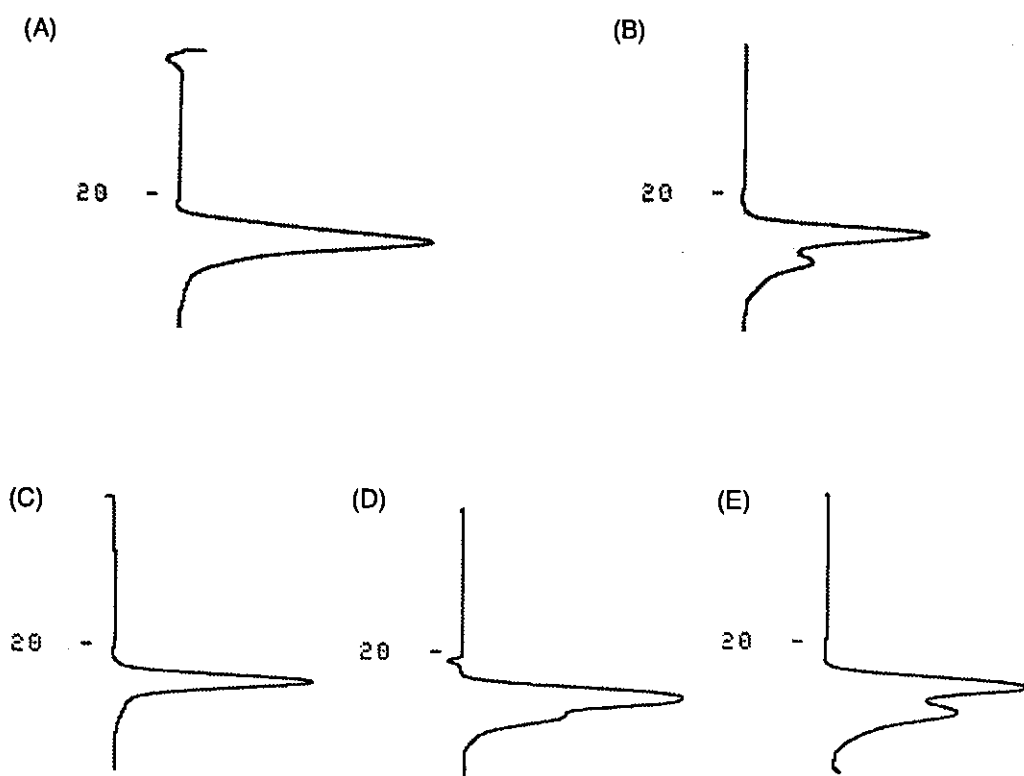


Figure 1. HPLC Chromatograms of Each Fraction from Amaseed Gum.  
(A) Fraction N, (B) Fraction A, (C) Fraction A1 (D) Fraction A2, and (E) Fraction A3

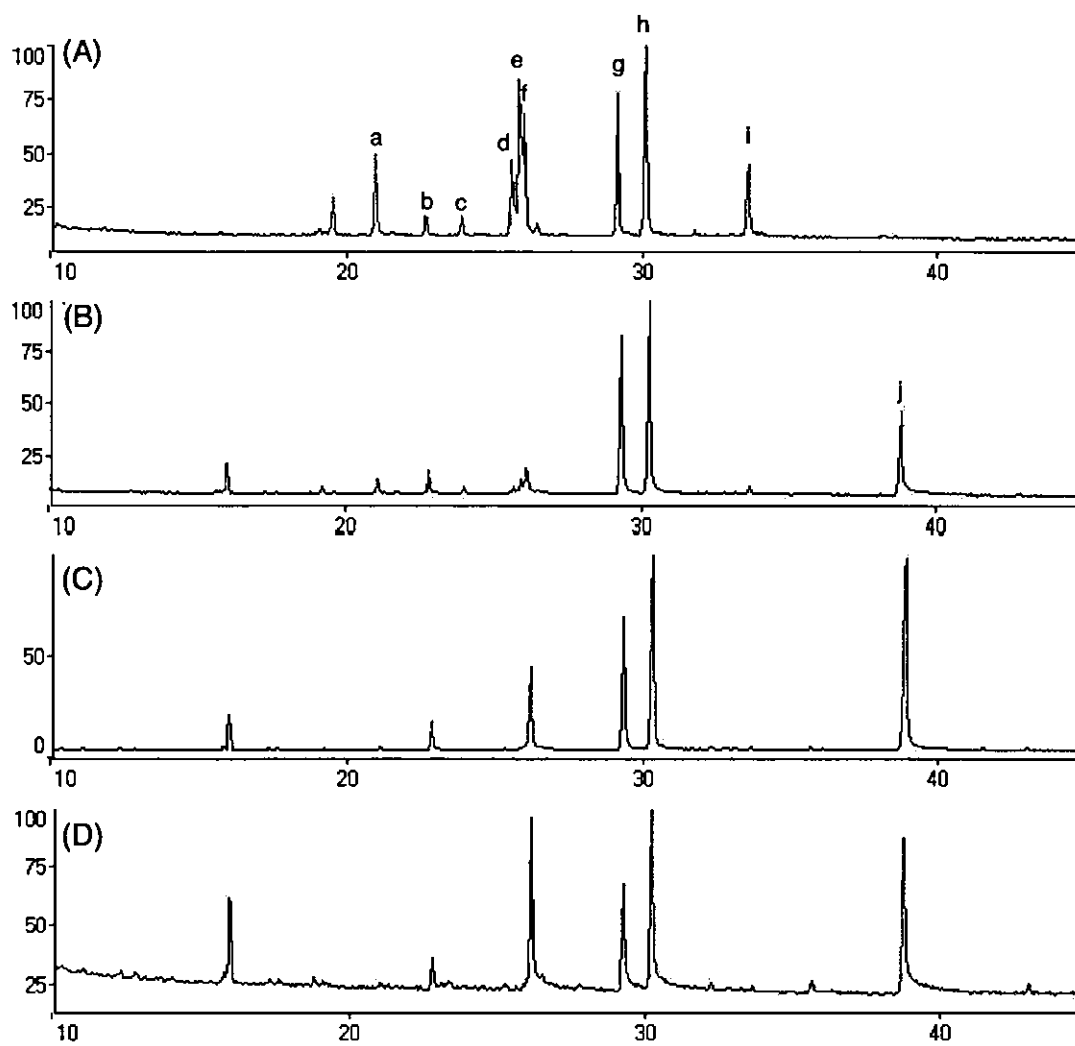


Figure 3. GC/MS Total Ion Chromatograms of (A) N, (B) A1, (C) A2, and (D) A3 Fractions from Amaseed Gum  
 Mass spectra of peaks (a-j) are shown in Figure 4.

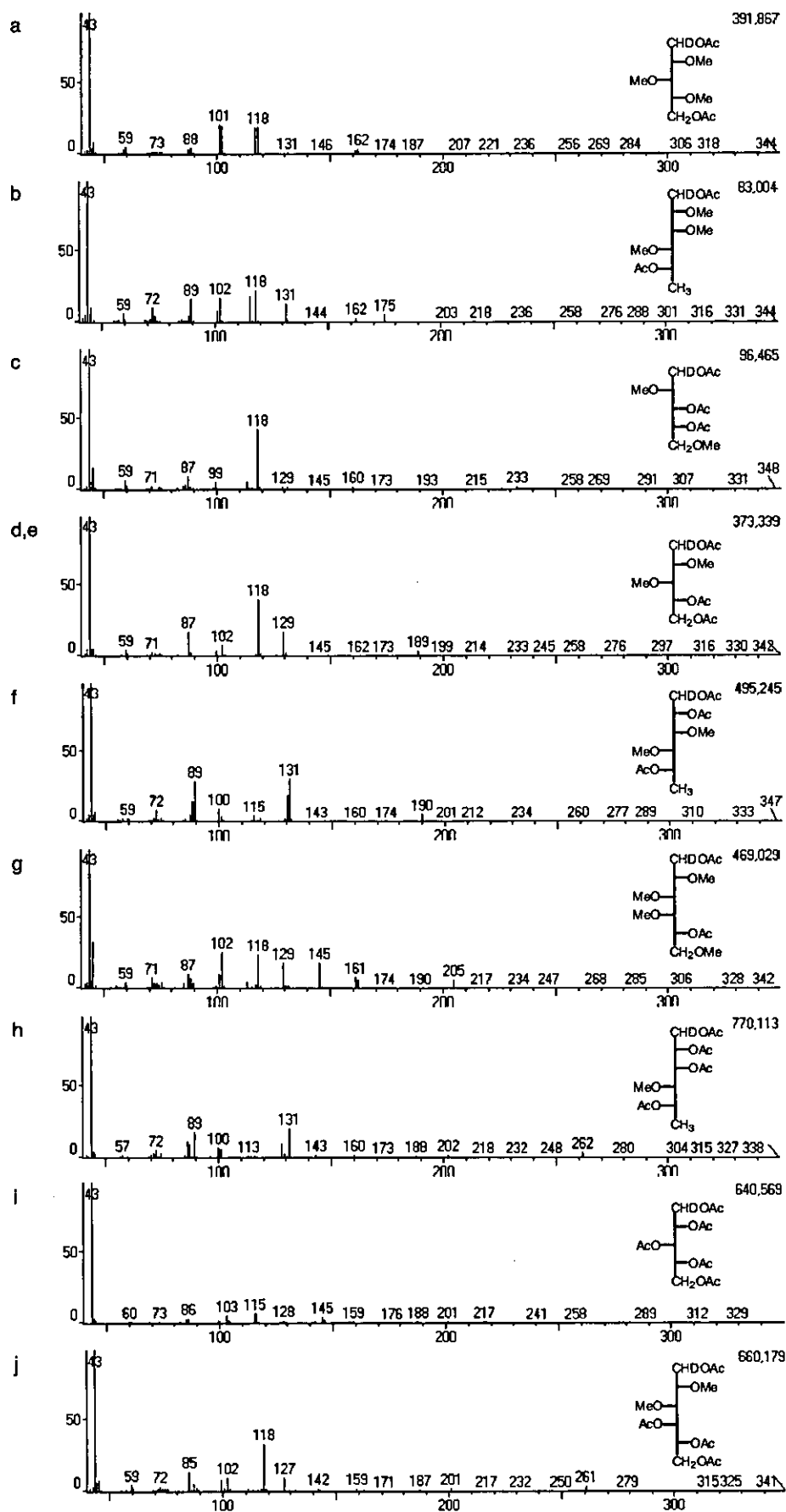


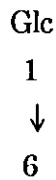
Figure 4. Mass Spectrum of Each Peaks of TIC

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  
既存添加物スクレロガムに関する研究

分担研究者 李 貞範 富山医科薬科大学 助手

研究要旨 スクレロガム中の多糖について単糖組成分析およびメチル化分析を行ったところ、1,3-グルカンで約 3 残基当たり 1 残基のペンダントとして主鎖の 6 位にグルコースが結合している



に示した構造であることが推定された。

#### A. 研究目的

既存添加物「スクレロガム（スクレログルカン）」は不完全菌類（*Sclerotium glaucanicum*）の培養液より、分離して得られた、主成分は多糖類であるとされている増粘安定剤である。本研究ではこのスクレログルカンの多糖体の構造的特徴を明らかにするため研究を実施した。

#### B. 研究方法

**研究材料および試薬** スクレログルカンは日本食品添加物協会より入手した。実験に用いた試薬は全て特級試薬を用いた。

**スクレログルカンの分画** 試料（0.5 g）を蒸留水（200 ml）に懸濁し、透析法（和光純薬工業シームレスセルローズチューブ）で分画した。透析内液および外液をそれぞれ濃縮後、凍結乾燥し、高分子量画分（SHM）および低分子量画分（SLM）をそれぞれ得た。SHM（収量 0.48 g 収率 80%）、SLM（収

量 0.09 g 収率 15%）

**構成糖の分析** 試料を 2 M TFA に懸濁後、121°C で 1 時間加水分解した。得られた加水分解物を NaBH<sub>4</sub> で還元後、1-メチルイミダゾール-Ac<sub>2</sub>O（1:10 v/v）を加え、室温で 1 時間の条件でアセチル化を行った。得られたアルジトールアセテートを GC で分析した。GC 条件：カラム J&W DB-1 MS（30 m × 0.32 mm）、カラム温度（100°C-250°C、5°C/min）、検出：MS

**メチル化分析** メチル化多糖の調製は Anumula & Taylor 法（*Anal. Biochem.*, 203, 101, 1992）に従って行った。乾燥した試料（1 mg）を DMSO（0.5 ml）に溶解後、NaOH-DMSO 試薬（0.5 ml）および CH<sub>3</sub>I（0.3 ml）を加え、超音波浴中で 7 分間反応させた。これを 2 M TFA で 121°C、1 時間加水分解し、NaBD<sub>4</sub> で還元後、1-メチルイミダゾール-Ac<sub>2</sub>O（1:10, v/v）を加え、室温で 1 時間アセチル化を行った。クロロホルム-水で分配後、得られた部分メチル化アル

ジトールアセテートを GC-MS で分析した。GC-MS 条件：カラム J&W DB-1MS (30 m×0.32 mm)、カラム温度 100–250°C (2°C/min)、検出 MS

### C. 研究結果

本試料を分画するに当たり、水に対する溶解性を検討したが、容易にゲル化が起こった。そこで、希薄溶液で懸濁し、溶解した低分子量成分を透析法により除去することにした。透析により高分子量画分 (SHM) と低分子量画分 (SLM) に分画した結果、それぞれ 0.48 g と 0.09 g 得られた。従って、本品の大部分は多糖などの高分子量物質であることが確認できた。SHM の構成糖を確認するために、SHM を 2 M TFA により完全酸加水分解後、アルジトールアセテート誘導体を調製し GC により分析したところ、グルコースのみが構成糖として確認された (Figure 1)。次に、メチル化分析により構成糖の結合様式を検討した結果、Glc(1→、→3)・Glc(1→、→3,6)・Glc(1→残基が約 1:2:1 の比で確認された (Figure 2)。しかしながら、微量ではあるが→4)・Glc(1→残基の存在も確認された。

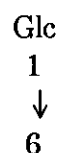
### D. 考察

スクレログルカンは水溶性β-3,6-グルカンであるとされている。今回、高分子量画分 (SHM, 収率 96%) について糖組成およびメチル化分析による構成糖の結合様式を検討したところ、本試料中の多糖体はβ-3,6-グルカンであることが推定された。メチル化分析の結果より、ごく少量の→4)・Glc(1→残基の存在が認められた。これは SHM はゲル化能が極めて高く、カラムクロマトグラフィーによる精製は出来なかったため、β-3,6-グルカン以外のごく微量のβグルカンの存在によるものと推定される。また、NMR による解析を目標に数種の溶媒 (D<sub>2</sub>O,

DMSO-d<sub>6</sub> など) に対する溶解性を検討したがいずれの条件でもゲル化が起こり、NMR 測定には至らなかった。今後、さらに溶解条件の検討が必要と思われる。

### E. 結論

今回検討したスクレログルカンは Glc(1→、→3)・Glc(1→、→3,6)・Glc(1→の存在が約 1:2:1 の比で確認されたことから、以下のような構造を持つ多糖を主として含むことが推定された。



しかしながら、ごく微量ではあるが→4)・Glc(1→残基の存在も確認されたことから、異なる多糖の混在も予想された。

### 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



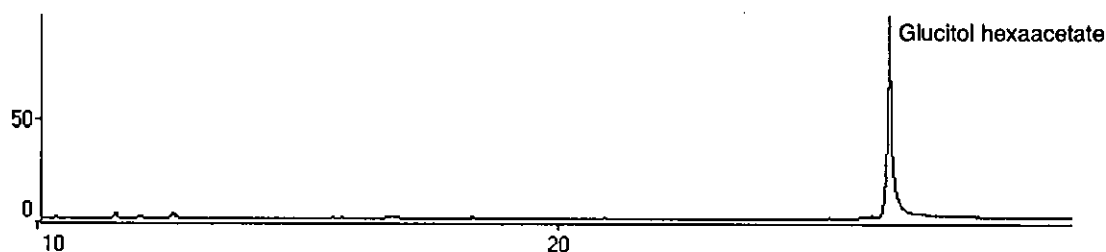


Figure 1. Total Ion Chromatogram of Alditol Acetate from Scleroglucan

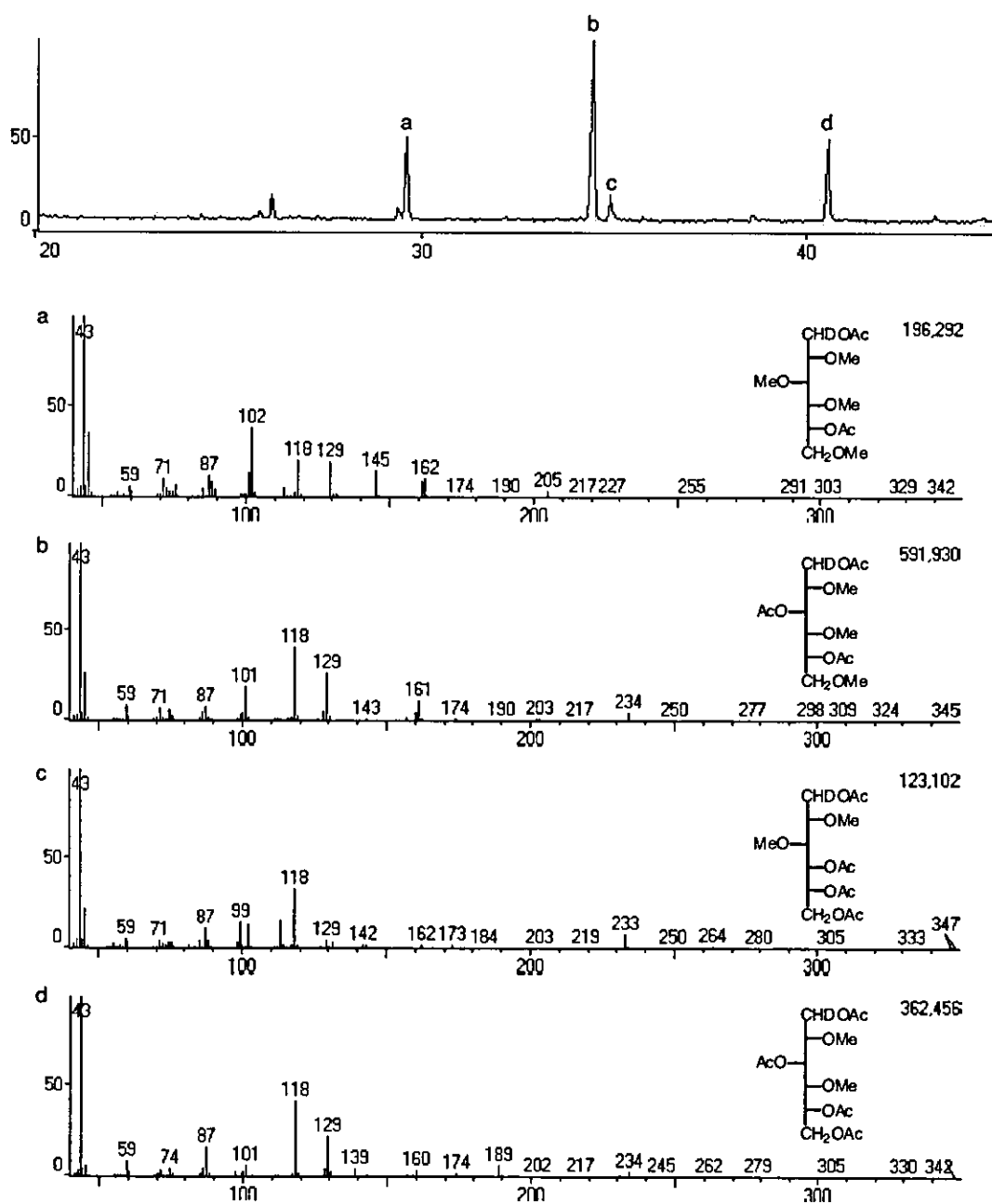


Figure 2. Total Ion Chromatogram and Mass Spectrum of Methylated Scleroglucan  
 Peak a: 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl glucitol, Peak b: 1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl glucitol  
 Peak c: 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl glucitol, Peak d: 1,3,5,6-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl glucitol

## エレミ樹脂の成分研究

分担研究者 尹 永淑 東京薬科大学生命科学部 助手

研究要旨 カンラン科に属するエレミ (*Canarium luzonicum* A.Gray) の樹脂よりシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、 $\alpha$ -アミリンと  $\beta$ -アミリンが単離され、 $\alpha$ -アミリンが主成分であることが明らかとなった。

### A. 研究目的

エレミ (*Canarium luzonicum* A.Gray) の分泌液を乾燥して得られたものを天然増粘安定剤として用いられているが、その詳細な含有成分については知られていない。そこで、含有成分の化学構造を明らかにし、食品添加物として安全性をより高めることを目的とした。

### B. 研究方法

エレミの樹脂 267 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い (Hexane と酢酸エチルの溶媒系)、3つの分画 (Frs. 1-3) を得た。Frs. 1 の分画 (139 g) から約 2 g を再びシリカゲルカラムクロマトグラフィーした後、prep-TLC を行い、化合物 1 と 2 を単離した。単離した化合物は NMR および GC-MS スペクトルより構造解析を行った。また、化合物 1 をピリジンと酢酸を用い、室温において 12 時間反応を行いアセチル化を行った。

GC-MS (GCMS-QP5050A) の条件：気化室初期温度：250 度、インタフェース温度：250 度、コントロールモード：スピリット、カラム入口

圧：100 kPa、カラム流量：1.0 mL/分。

NMR 測定： $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは Bruker DPX-400 spectrometers を用い、Standard plus sequences and parameters は標準のものを使用した。また、 $^1\text{H}$  chemical shifts in  $\text{CDCl}_3$  は 7.16 ppm、 $^{13}\text{C}$  chemical shifts 77 ppm に内部標準とした。

### C. 研究結果

化合物 1 は GC-MS スペクトルにより分子量を 218 を示した。また、1次元の NMR スペクトルによりトリテルペンであることが示唆された。詳細なデータの解析および文献と比較した結果  $\alpha$ -アミリンであることが判明した。また化合物 2 は化合物 1 と同様な手法を用い、構造解析を行った結果、 $\beta$ -アミリンであることを明らかにした。さらに、化合物 1 のアセチル化により 3 位における水酸基も確認された。

また、提供されたサンプルを GC-MS により分析した結果、 $\alpha$ -アミリンが 78.6 %、 $\beta$ -アミリンが 21.4 % 検出され、その他の化合物

は検出されなかった。

#### **D. 考察**

エレミの樹脂は極性が非常に低く、化合物が類似していたため、分離が困難である。シリカゲルを用いた分離・精製は主成分のみ単離された。

#### **E. 結論**

エレミ樹脂の主成分は $\beta$ -アミリンではなく、 $\alpha$ -アミリンであることが明らかになった。

#### **F. 研究発表 ((関連のものがあれば))**

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

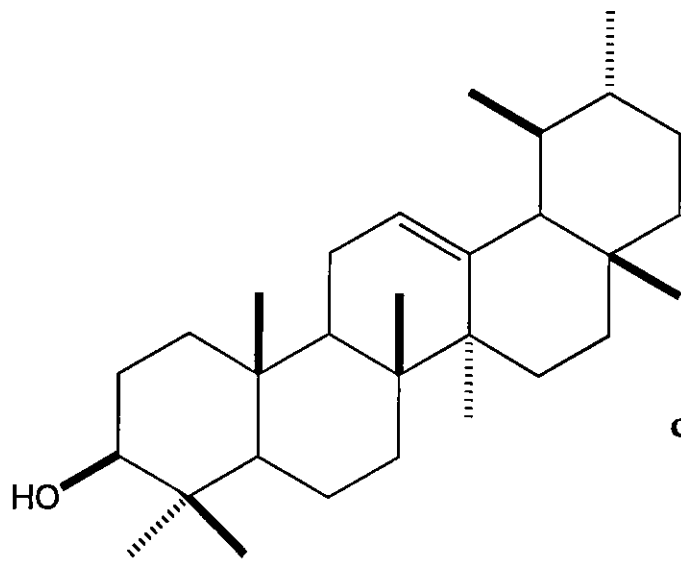
#### **G. 知的所有権の取得状況**

##### 1. 特許取得

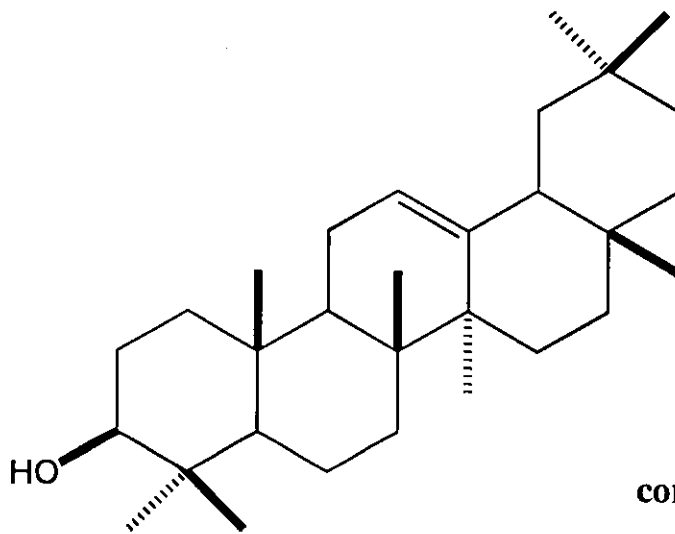
なし

##### 2. 実用新案登録

なし



**compound 1:  $\alpha$ -amyrin**



**compound 2:  $\beta$ -amyrin**