

どちらの画分についても 930 cm^{-1} および 845 cm^{-1} に吸収が認められたことから、3,6-アンハイドロガラクトースおよび4位が硫酸化されたD-ガラクトースの存在が示唆された (Fig. 3)。

^1H NMR スペクトルを両画分について測定したところ (Fig. 4)、FuKS では多くの α 結合した糖残基のアノメリックプロトン ($5.0 - 5.4\text{ ppm}$) に由来するシグナルが観測されたのに対し、FuKP では1本のシグナルのみが観測された。また、FuKP の ^{13}C NMR スペクトルを測定したところ、 104.8 ppm と 97.3 ppm に2本のアノメリックカーボンに由来するシグナルが観測された。これらは、 κ -カラゲenanの文献値とも一致することから、FuKP は κ -カラゲenanであることが示唆された。

D. 考察

ファーセラランより 0.2 M KCl で沈殿する画分について分析を行ったところ、これは κ -カラゲenanもしくは類似した構造を持つ多糖であることが示唆された。しかしながら、沈殿しない画分中には数種の多糖が混在していることが予想された。これらについてさらに分画を進める必要があるが、ファーセララン、及びそれぞれの画分はいずれも極めて溶解性が悪く、ゲルを形成しやすい。従って、カラムクロマトグラフィーによる分画は困難であった。従って、何らかの分画条件を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

本試料中には κ -カラゲenanなど数種の多糖が含まれていることが推察された。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

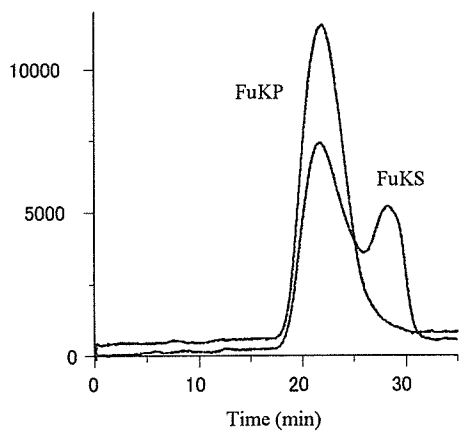


Fig. 1. HPLC chromatogram of FuKS and FuKP.



Fig. 2. Electrophoretic pattern of FuKS and FuKP

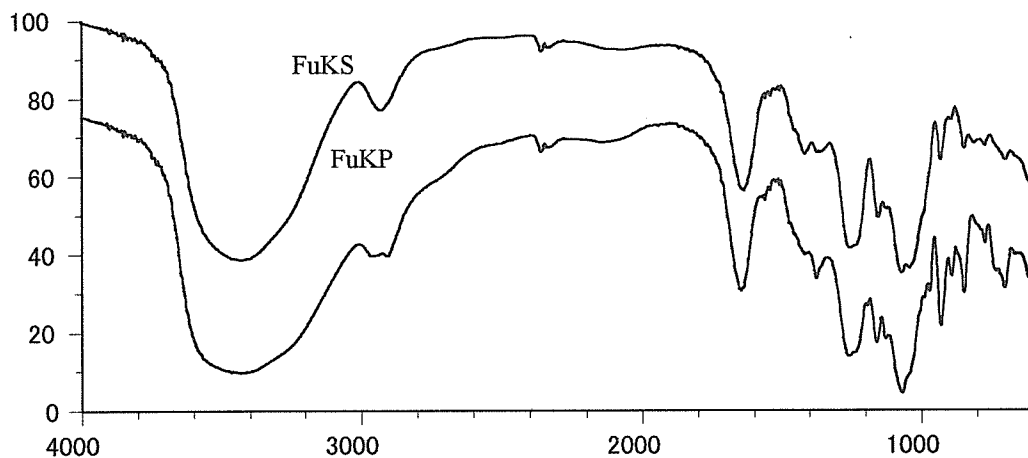


Fig. 3. IR spectrum of FuKS and FuKP

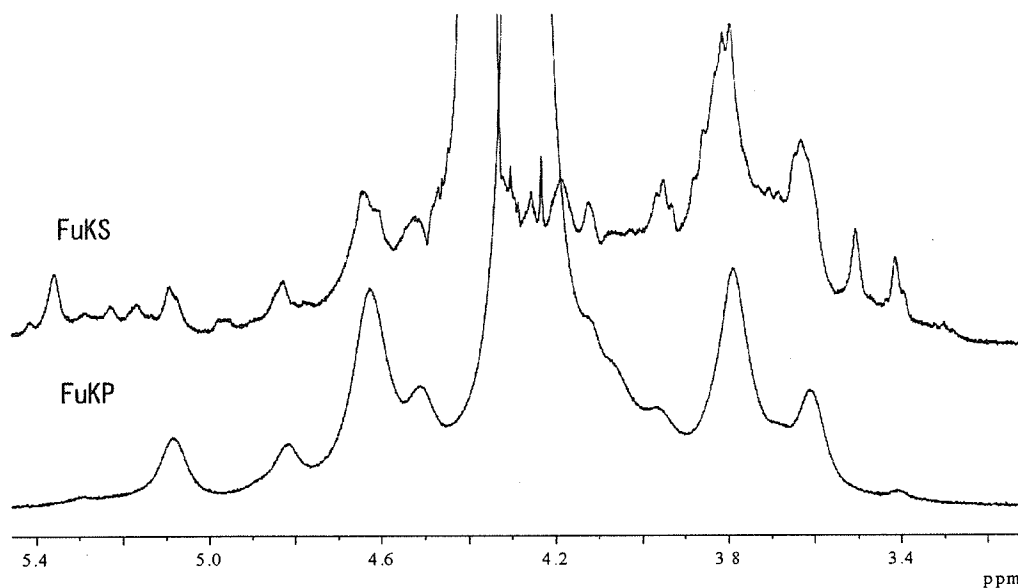


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of FuKS and FuKP

Table 1. Methylation analysis of FuKS and FuKP

	FuKS	FuKP
AnGal		
→4)-AnGal-(1→	11.5	36.8
Gal		
→3)-Gal-(1→	16.9	24.6
→4)-Gal-(1→	10.0	4.1
→6)-Gal-(1→	2.7	
→3, 4)-Gal-(1→	23.8	26.9
→3, 6)-Gal-(1→	7.4	3.2
→4, 6)-Gal-(1→	7.0	1.6
→2, 3, 6)-Gal-(1→	2.2	
→3, 4, 6)-Gal-(1→	8.5	2.8
Glc		
→4)-Glc-(1→	4.8	
→2, 6)-Glc-(1→	2.0	
→4, 6)-Gal-(1→	2.1	
Xyl		
Xyl-(1→	1.2	

Each value was represented as mol%.

要旨 7 品目の増粘多糖類試料を酸加水分解し、ジエチルジチオアセタール化と TMS 化を行って GC-FID で分析することにより、構成糖の同定と定量を行い、糖組成を明らかにした。また、基原植物の異なるアラビアガム 2 製品の糖組成の違いとロットの異なるモモ樹脂 2 製品の糖組成の違いを明らかにした。この方法によって品目を互いに区別することが可能であることが示され、また、製品の品質評価に応用できる可能性が示唆された。

A. 目的

わが国の増粘多糖類の公的規格では、確認試験として物理的性質を用いた方法が設定されている。一方、一般に天然由来食品添加物の品質は材料の採取時期などの影響を受ける。また、食品添加物製品が原体ではなく、他の糖類が添加されている場合がある。そのため、現在の方法では品質の変動や他の糖類の混入を評価することができない事例が考えられる。

そこで、多糖類の糖組成を分析することにより確認試験や品質の評価を行うことができないか検討する。試料を酸加水分解し、GC を用いて生じる単糖の同定と定量を行い、この方法が増粘多糖類の試験法として利用できるかどうか検討し、また、品質を評価する手段として応用できるかどうか検討する。

多く用いられる増粘多糖類 7 品目を分析し、分析法の検討を行う。次に、アラビアガムの原料植物として 2 種が知られているので、これらを区別できるかどうか検討する。また、モモ樹脂については十分な数の製品を用いた調査がなされていないため、2 種の製品を分析して構成糖の検討を行う。

B. 方法

(1) 試料および試薬

試料は以下のものを使用した。

カロブビーンガム、グァーガム、カラヤガム、ガティガム、トラガントガム:SIGMA 製試薬
アラビアガム 1:SIGMA 製試薬
アラビアガム 2 および 3:食品添加物製品。2 は *Acacia senegal* 由来であり、3 は *Acacia seyal* 由来である。

モモ樹脂 1 および 2:食品添加物製品

食品添加物製品は日本食品添加物協会を通じて入手した。

単糖:D-キシロース, L-アラビノース, L-ラムノース, L-フコース, D-ガラクチュロン酸, D-グルクロン酸, D-グルコース, D-マンノースおよび D-ガラクトースは試薬グレードのものを用いた。

試薬:トリフルオロ酢酸(TFA), ピリジン, ヘキサメチルジシラザン(HMDS), *n*-ヘキサンは特級, エタンチオールは一級の試薬を用いた。

(2) 標品の誘導体化

10 mmol/L 混合溶液を 0.1 mL を反応容器にとり、減圧乾固した。100 μ L のエタンチオール-TFA 混液(2:1)を加えて室温で 10 分間

置いた後、250 μL のピリジン、500 μL の HMDS、1500 μL の TFA を順に加え、ときどき振り混ぜながら室温で 1 時間置いた。窒素気流下で溶媒をできるだけ除いた後、250 μL の水を加えて混合し、続いて *n*-ヘキサンで目的成分を抽出した。

(3) 試料の加水分解と誘導体化

試料を密閉ガラス試験管にとり、2 mol/L TFA を加えて溶かし、混合した後、窒素ガス置換を行い、105°C で加熱した。0.2 mL を反応容器にとり、減圧乾固した。100 μL のエタンチオール-TFA 混液 (2 : 1) を加えて室温で 10 分間置いた後、250 μL のピリジン、500 μL の HMDS、1500 μL の TFA を順に加え、ときどき振り混ぜながら室温で 1 時間置いた。窒素気流下で溶媒をできるだけ除いた後、250 μL の水を加えて混合し、続いて *n*-ヘキサンで目的成分を抽出した。

(4) GC/MS

Instrument: GCMS-QP5050A (Shimadzu)

Conditions: column, DB-5MS (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness); injection, split; column temperature, 165°C (0 min) \rightarrow (2°C/min) \rightarrow 235°C; detection, EI positive.

(5) GC/FID

GC conditions: instrument, Shimadzu GC-14B; column, DB-1 0.25 mm i.d. \times 30 m, film thickness, 0.25 μm (J&W); temperature, 165°C (0 min) \rightarrow (2°C/min) \rightarrow 235°C (0 min); split injection; detection, FID.

(倫理面への配慮)

特に無し。

C. 結果

試料を TFA で酸加水分解し、エタンチオールによるジエチルジチオアセタール化と

HMDS による TMS 化を施して誘導体とし、ヘキサン抽出を行って GC/MS と GC/FID で分析した。単糖を同様に誘導体化したものを標準物質として分析した。

GC-FID における標準溶液のクロマトグラムを Fig. 1A に示した。D-Xyl, L-Ara, L-Rha, L-Fuc, D-GalUA, D-GlcUA, D-Glc, D-Man, D-Gal の誘導体をいずれも 1 本のピークとして検出し、互いに分離することができた。GC/MS においては単糖誘導体のマススペクトルは m/z 73 を持つなど特徴を有しており、実試料に存在するマトリックスとの区別が可能と考えられた。標準溶液から希釈系列を作成し、GC/FID で分析して検量線を作製した。

多糖類酸加水分解物を分析した。保持時間から酸加水分解産物中の糖の同定を行い、標準溶液を用いて作製した検量線を用いて、GC/FID のピーク面積から定量を行った。糖以外の成分との区別が困難な小さいピークについては GC/MS により単糖誘導体の特徴的なマススペクトルを利用して同定を行った。

多糖類加水分解物検液のクロマトグラムを Fig. 2B-H に示した。

7 品目の増粘多糖類を 105°C で 6 時間加水分解し、分析した結果を Table 1 に示した。カロブبینガムとグァーガムは同じ糖から構成されており、アラビアガムとガティガムの差異は含量の少ない D-Man のみであったが、他の品目との区別は十分可能であった。カロブبینガムとグァーガムについては、D-Man と D-Gal のモル比を、アラビアガムとガティガムについては、L-Ara と L-Rha のモル比を算出した (Table 1)。いずれも明らかな差異が認められた。

アラビアガム 3 試料を 105°C で 6 時間加水分解し、分析した結果を Table 2 に示した。試

料 1 と試料 2 は組成比が類似していたが、試料 3 は大きく異なっていた。

モモ樹脂 2 製品を 105°C で 6, 11, 23 および 35 時間加水分解し、分析した。構成糖の検出量が最も高かった加水分解条件は D-Xyl, L-Ara, L-Rha および D-Gal が 6 時間, D-GlcUA および D-Man が 11 時間であった。そこで、この条件における検出量を各単糖の含量とみなして構成比を算出し、Table 3 に示した。試料 2 は試料 1 と比較して D-Xyl, L-Rha, D-GlcUA および D-Man の構成比が高く、L-Ara および D-Gal の構成比が低いことがわかった。

D. 考察

試料を加水分解し、ジエチルジチオアセタール化と TMS 化を行うことにより、GC/MS で構成する単糖を 1 本のピークとして検出し、定量することができた。

検討した 7 品目については、構成糖の種類と主要構成糖のモル比によって、互いに区別することが可能であることがわかった。今後多くの製品を分析し、変動の範囲を明らかにすれば、製品の品質評価にも応用できると考えられる。

今回得られた結果から、*A. senegal* 由来の製品と *A. seyal* 由来の製品では糖組成が明らかに異なることがわかる。また、試料 1 は *A. senegal* 由来であることが強く示唆される。

モモ樹脂の 2 製品の組成比が異なっていたのは、品種や産地等の違いによるものと考えられる。今後、多くの製品について糖組成を調べ、差異の程度を検討する必要があると思われる。

E. 結論

多糖類試料を酸加水分解し、ジエチルジチオアセタール化と TMS 化を行って GC-FID で

分析することにより、カロブベーンガム、グァーガム、カラヤガム、アラビアガム、ガティガム、トラガントガム、モモ樹脂を互いに区別することが可能であった。

アラビアガムは *A. senegal* 由来の製品と *A. seyal* 由来の製品では糖組成が異なっていた。

モモ樹脂の 2 製品の間で構成糖のモル比が異なっていた。

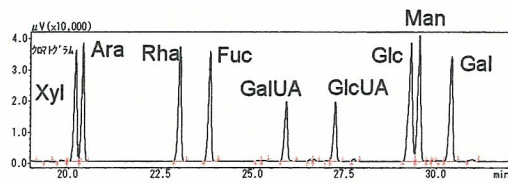
F. 研究発表

なし。

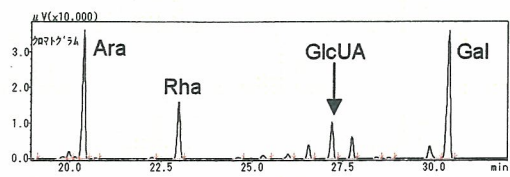
G. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

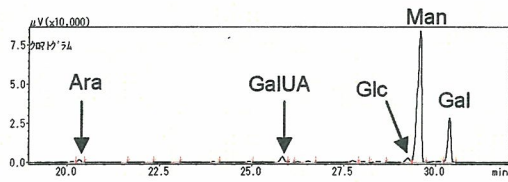
A. Standard (1 nmol)



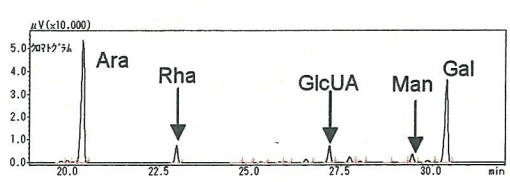
E. Gum Arabic 1 (0.1 μg)



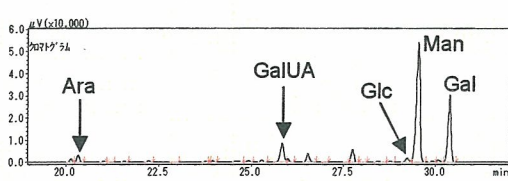
B. Carob bean gum (0.1 μg)



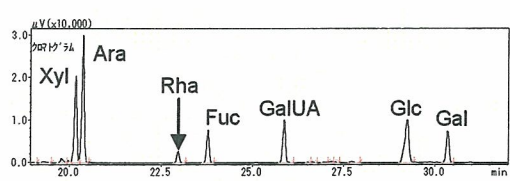
F. Gum Ghatti (0.1 μg)



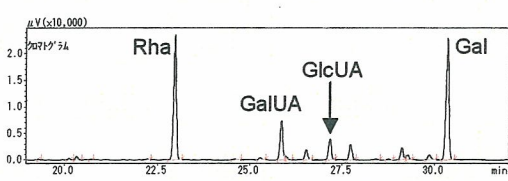
C. Guar gum (0.1 μg)



G. Gum Tragacanth (0.1 μg)



D. Karaya gum (0.1 μg)



H. Peach gum 1 (0.1 μg)

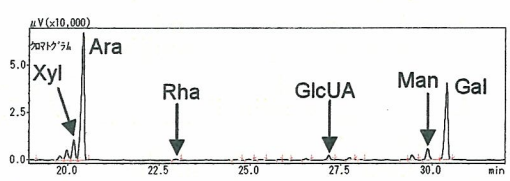


Fig. 1. The chromatograms of the standard solution and test solutions.

Table 1. Quantitation of liberated sugars.

	Carob	Guar	Karaya	Arabic 1	Ghatti	Traga	Peach 1
Ratio (mol%)							
Xyl						20.4	8.6
Ara	1.3	2.8		35.5	51.2	30.4	54.5
Rha			33.6	13.6	5.6	2.8	0.5
Fuc						8.0	
GalUA	5.4	16.6	20.5			18.6	
GlcUA			9.4	14.6	9.2		3.0
Glc	1.8	1.3				11.7	
Man	70.2	51.9			2.6		1.9
Gal	21.3	27.3	36.5	36.3	31.4	8.1	31.5
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Man / Gal	3.30	1.90					
Ara / Rha				2.61	9.15		

Table 2. Compositions of Gum Arabic.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
	Reagent	<i>A. senegal</i>	<i>A. seyal</i>
Ratio (mol%)			
Xyl			
Ara	40.8	41.0	59.1
Rha	13.8	12.7	3.7
GlcUA	13.4	14.6	8.3
Gal	32.0	31.7	28.9
Total	100.0	100.0	100.0

Table 3. Compositions of Peach gum.

	Sample 1		Sample 2	
	Amount* (nmol)	Ratio (mol%)	Amount (nmol)	Ratio (mol%)
Xyl	621.5	9.0	710.6	11.0
Ara	3985.3	57.5	3510.3	54.2
Rha	32.0	0.5	64.6	1.0
GlcUA	287.3	4.1	357.4	5.5
Man	135.0	1.9	142.0	2.2
Gal	1866.6	26.9	1687.8	26.1
Total	6927.7	100.0	6472.7	100.0
Ara/Gal	2.14		2.08	

* Amount in 2 milligrams.

6. ガムベースの成分・品質に関する研究

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

ガムベース等の成分・品質に関する研究

分担研究者 秋山卓美 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 既存添加物名簿に記載されているテルペノイド系ガムベースの品質規格策定を目的として、エレミ樹脂・ニューコウ・ベンゾインガムについて成分と確認試験法に関する研究を行った。LC/MS による分析では、いずれの品目についても主要構成成分を検出することができ、そして、品目に特異的で指標成分になり得る化合物が検出された。GC/MS を用いた場合、誘導体化した試料の分析により、いずれの品目においても主要構成成分を検出でき、特異的で指標成分になり得る化合物が検出された。以上のように、LC/MS, GC/MS とも確認試験法として有用であることが示された。

A. 研究目的

既存添加物名簿に記載されているガムベースの中には、未だ公的規格が策定されていないものが多い。構成成分が十分明らかになっていない品目があること、試験法の検討が不十分であることなどに依る。

ガムベースには高分子からなるものと水溶性の低い低分子からなるものがあるが、低分子のものの中にテルペノイドが主成分と考えられるものがある。これらの品目の品質規格策定を目的として、構成成分の分離・同定を利用した確認試験法に関する研究を行った。昨年の報告で、TLC で分離してパターンから同定する方法と、トリテルペノイドが主成分とされているマスチックとダンマル樹脂を LC/MS や GC/MS で分析し、指標成分になり得る化合物の分離・同定ができることを報告した。引き続き本研究では、トリテルペノイドが主成分とされているエレミ樹脂、ニューコウ、ベンゾインガムの 3 品目について、LC/MS と GC/MS により分析した結果について報告する。

B. 研究方法

(1) 試料

以下の試料を入手した。食品添加物製品は日本食品添加物協会より入手した。

エレミ樹脂:食品添加物の 1 製品。ニューコウ:一般香料用 2 製品。ベンゾインガム:一般香料用 2 製品。

試料を乳鉢で粉末状にした後秤量し、20 mg/ml の濃度となるようにメタノールを加えて攪拌後、3,000 rpm, 20°C で 20 分間遠心分離を行い、その上清をフィルターろ過してメタノール抽出液とした。メタノール抽出液にトリメチルシリルジアゾメタン(東京化成)を反応量加え、30 分反応させてメチル化試料とした。メタノール抽出液 1 mL を減圧乾固し、TMSI-H (GL Science) 0.5 mL を加えて 60°C で数分反応させ、TMS 化試料とした。メタノール抽出液 1 mL をメチル化した試料を減圧乾固し、TMSI-H 0.5 mL を加えて 60°C で数分反応させて TMS 化し、メチル化 TMS 化試料とした。

(2) LC/MS

Instrument: Micromass ZQ system (Waters)

HPLC conditions: column, ODS-100S (2.0 mm i.d. × 15 mm, Tosoh); column temperature, 35°C; solvent A, 80% acetonitrile; solvent B, 98% acetonitrile; solvent C, acetonitrile; flow rate, 0.4 ml/min; detection, PDA.

Gradient profile: 0–15 min, 100% A–100% B; 15–19 min, 100% B; 19–25 min; 100% B–100% C; 20–25 min, 100% B; 25–26 min, 100% C–100% A.

MS conditions: APCI positive or negative; cone voltage, 30 V; corona current, 1 μA.

(3) GC/MS

Instrument: GCMS-QP5050A (Shimadzu)

Conditions: column, DB-1MS (30m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness); injection, splitless; column temperature, 40°C (1 min) → (20°C/min) → 200°C → (10°C/min) → 300°C; detection, EI positive.

(倫理面への配慮)

特に無し.

C. 結果及び考察

(1) エレミ樹脂

まずエレミ樹脂について述べる.

初めに LC/MS により分析した (Figs. 1 and 2). ODS カラムを用いて分離し, 大気圧化学イオン化法 (APCI) で検出する LC/MS でメタノール抽出物を分析し, 分子イオンピークとフラグメントピークから成分を同定した. Fig. 1 のクロマトグラムは, 上から順にダイオードアレイ検出器, APCI+ の TIC, APCI- の TIC, APCI+ における m/z 425.3 のマスクロマトグラムである. また, クロマトピークのマススペクトルの例を Fig. 2 に示した. APCI+ による分析で, α -amyrin (1) と β -amyrin (2) が検出された. TIC ではクロマトピークとして検出できなかったが,

MC では別々のピークとして検出された. Fig. 2A と Fig. 2B は 1 または 2 のマススペクトルであるが, m/z 425 のマスピークがベースピークであり, 他に m/z 407 のマスピークが見られる. m/z 425 のピークがプロトン付加イオン $[M+H]^+$ であり, m/z 407 は $[M+H-H_2O]^+$ である.

次に誘導体化を行った試料を GC/MS で分析した (Fig. 3). 上がメチル化試料, 下がメチル化+TMS 化試料の TIC である. メチル化した試料で大きなクロマトピークが 2 本見られるが, これらは 1 と 2 である. メチル化されない状態で検出された. メチル化後に TMS 化した試料では, α -amyrin trimethylsilyl ether (1b) と β -amyrin trimethylsilyl ether (2b) の他, brein (3), ψ -taraxastane-3 β ,20 α -diol (4), α -elemolic acid (5), β -elemolic acid (6) の誘導体が検出された.

(2) ニュウコウ

次にニュウコウについて分析した.

まず LC/MS により分析した (Figs. 5 and 6). APCI- の TIC では α -boswellic acid (7) や β -boswellic acid (8) やこれらのデヒドロ体である 9,11-dehydro- α -boswellic acid (9) と 9,11-dehydro- β -boswellic acid (10), アセチル体である acetyl- α -boswellic acid (15) や β -boswellic acid (16) などが検出された. Fig. 6A に 9 と 10 のマススペクトルを示した. $[M-H]^-$ である m/z 453 のマスピークが見られる. APCI+ の TIC では acetyl-11-keto- β -boswellic acid (18) が検出された. Fig. 6B に示したマススペクトルでは $[M+H]^+$ である m/z 513 のマスピークがベースピークとなっている.

続いて誘導体化を行った試料を GC/MS で分析した (Fig. 7). 誘導体化を施していない試料ではピークが見られない (Fig. 7A) が, メ

チル化した試料では α -boswellic acid methyl ester (7a)や β -boswellic acid methyl ester (8a) など多くのピークが検出された (Fig. 7B). TMS 化した試料 (Fig. 6C)とメチル化と TMS 化を行った試料 (Fig. 6D)でも多くの誘導体が検出された. ただし, 同定できないピークも多く見られた.

(3) ベンゾインガム

最後にベンゾインガムについて分析した.

初めに LC/MS で分析し, Fig. 9と Fig. 10に結果を示した. APCI+, APCI-とも TIC で sumaresinolic acid (19)が検出されている. APCI+のマススペクトル (Fig. 10A)では $[M+H]^+$ である m/z 473 のマスピークが, APCI-のマススペクトル (Fig. 10B)では $[M-H]^-$ である m/z 471 のマスピークが見られた.

GC/MS による誘導体化試料の分析 (Fig. 11)では, メチル化試料からモノメチル体 (19a), TMS 化試料からジ TMS 体 (19e)が, メチル化と TMS 化を施した試料からモノメチルモノ TMS 体 (19c)が検出されている.

D. 考察

いずれの品目についても, トリテルペノイド系の主要構成成分を検出することができた. さらに検出された成分を品目間及び製品間で比較し, それぞれの品目に特異的で, 確認試験における指標成分となり得る化合物が存在した.

エレミ樹脂では 1と 2である. LC/MS では 1と 2, GC/MS では 1bと 2bである. ニュウコウでは 7, 8, 9, 10である. LC/MS では 7, 8, 9および 10, GC/MS では 7c, 8c, 9aおよび 10aである. ベンゾインガムでは 19である. LC/MS では 19, GC/MS では 19a, 19c および 19e である.

このように, エレミ樹脂, ニュウコウおよびベンゾインガムについても, LC/MS と GC/MS が確認試験法として有用であることが示された. ニュウコウとベンゾインガムは消除予定添加物名簿に入っており, 消除された場合, 未指定添加物の検出法として有用になると考えられる.

E. 結論

(1) エレミ樹脂, ニュウコウ, ベンゾインガムのメタノール抽出物を ODS カラムを用いた LC/MS で分析したところ, いずれの品目についても, トリテルペノイド系の主要構成成分をすべて検出することができ, また, 品目に特異的で指標成分になり得る化合物が検出されたため, LC/MS が確認試験法として有用であることが示された.

(2) 試料のメタノール抽出物, メチル化した試料, TMS 化した試料, メチル化と TMS 化を行った試料を GC/MS で分析した. いずれの品目についても, 特異的で指標成分になり得る化合物を含めたほとんどの主要構成成分が検出されたので, GC/MSもまた確認試験法として有用であることが示された.

F. 研究発表

なし.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

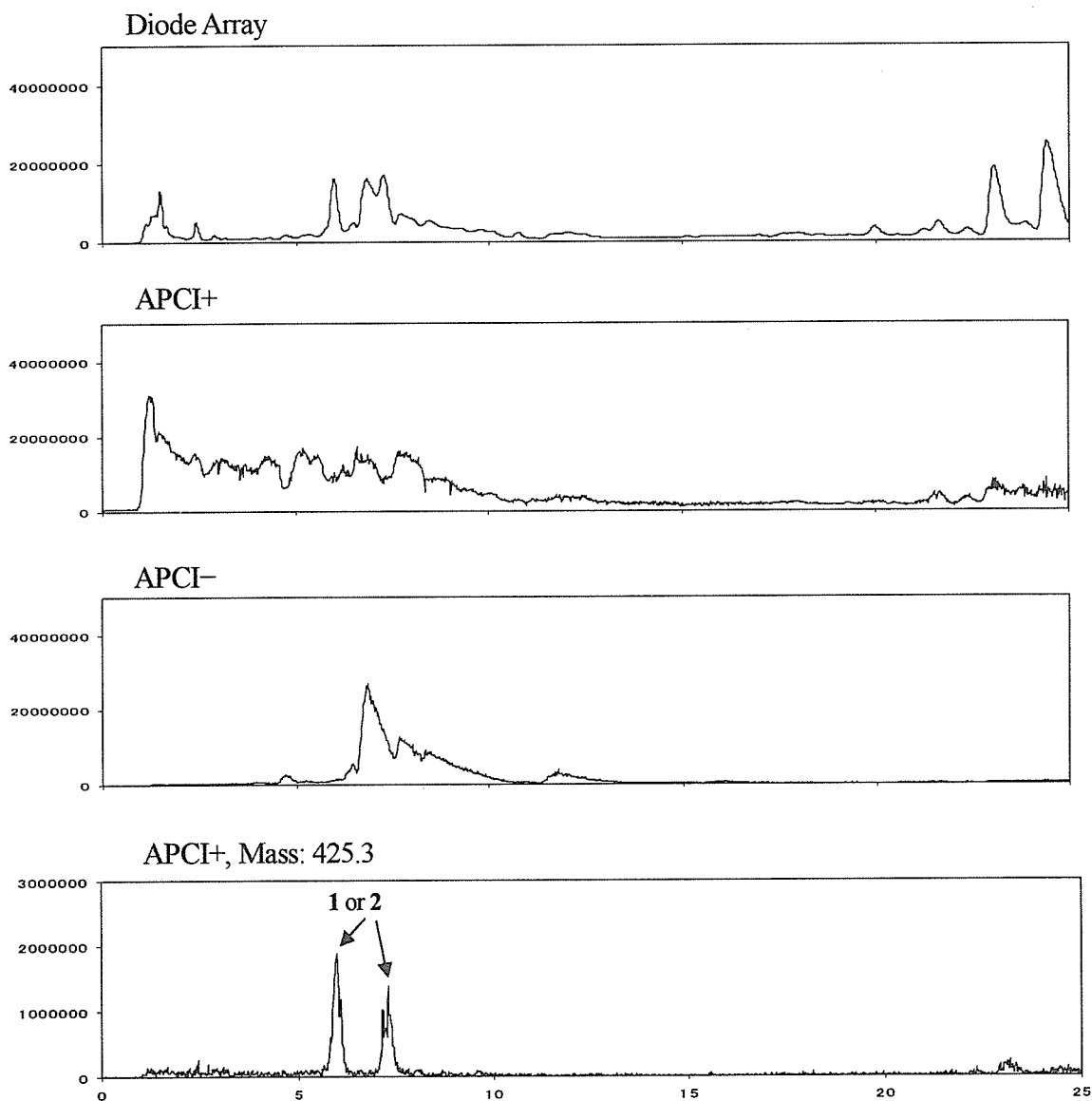


Fig. 1 エレミ樹脂のLC/MS分析

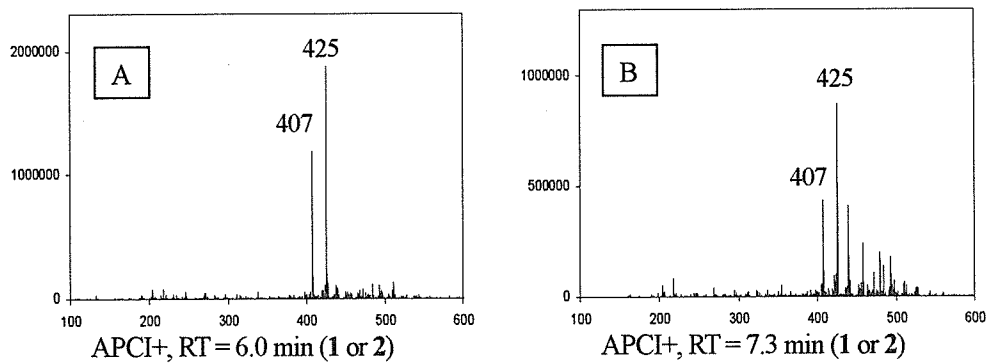


Fig. 2 エレミ樹脂のLC/MS分析

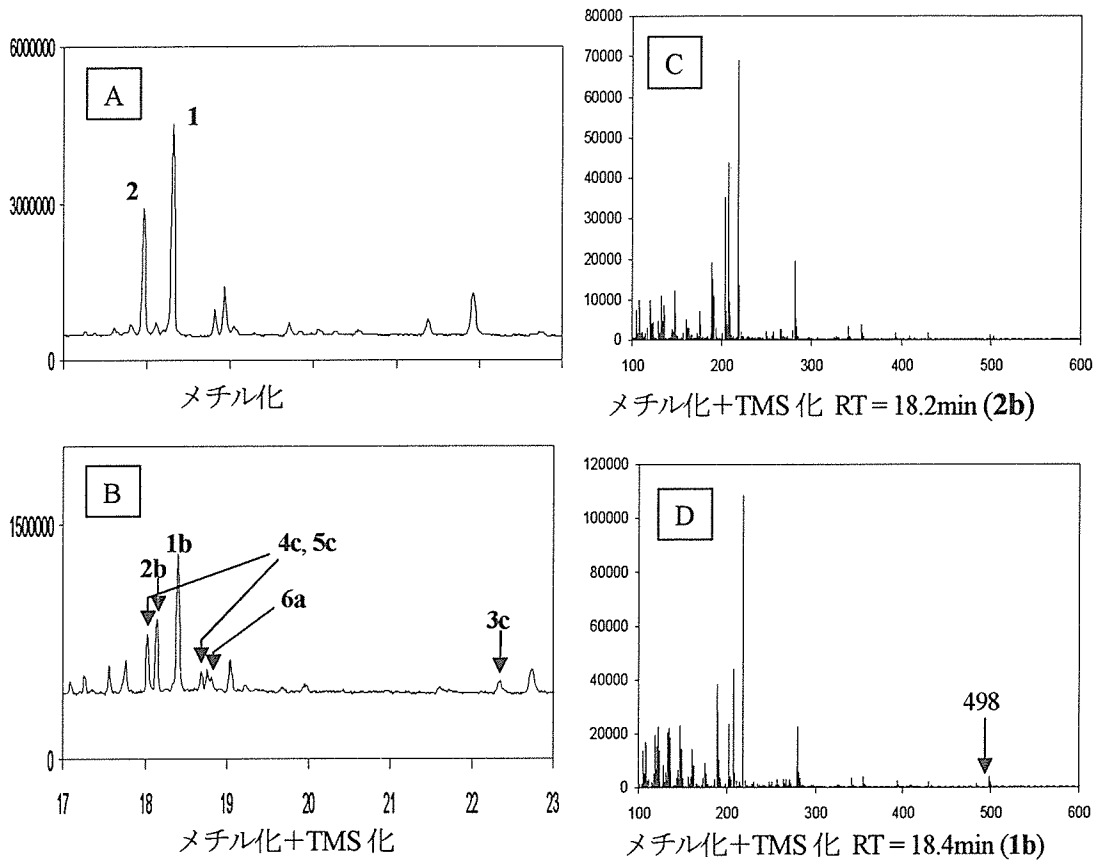


Fig. 3 エレミ樹脂のGC/MS分析

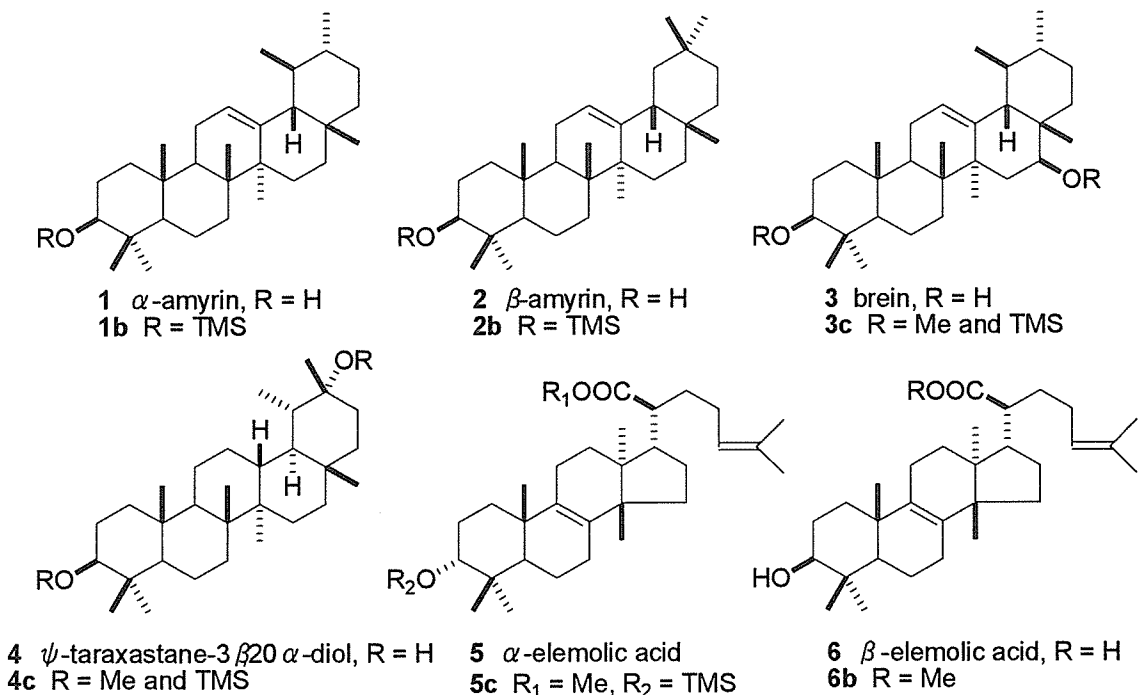


Fig. 4 エレミ樹脂の構成成分

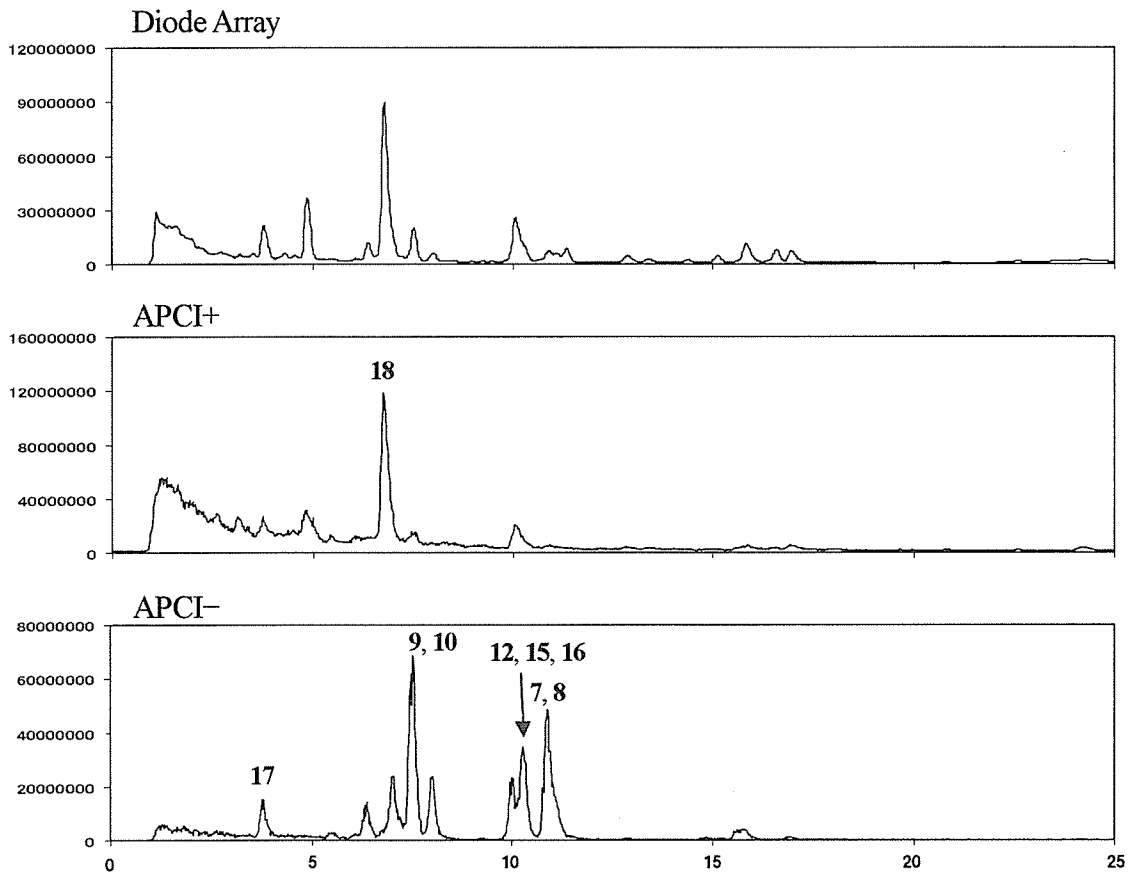


Fig 5 ニュウコウのLCMS分析

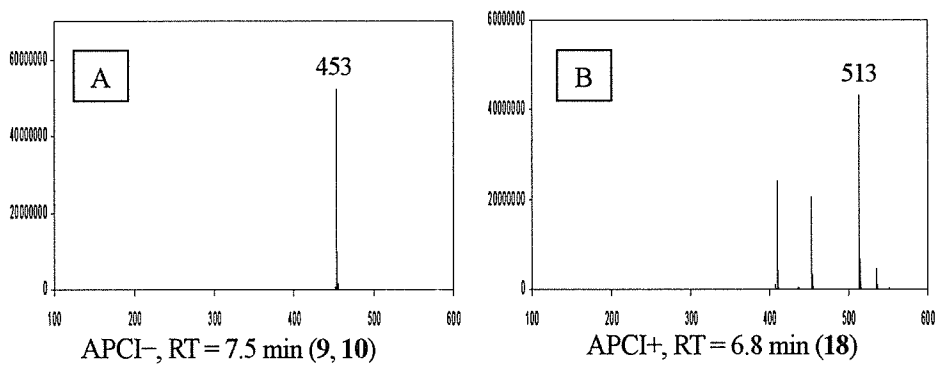


Fig 6 ニュウコウのLCMS分析

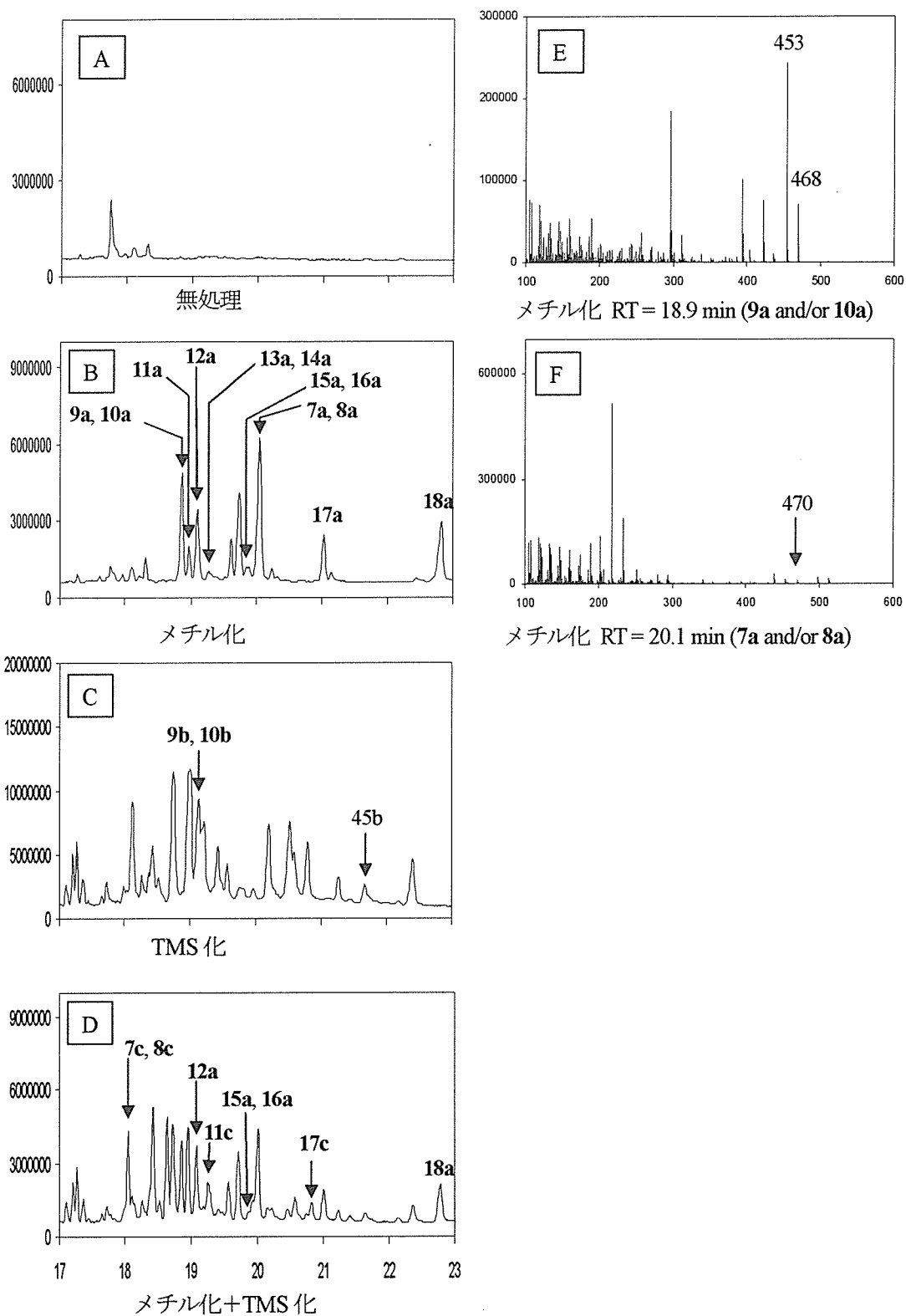


Fig. 7 ニュウコウのGC/MS分析

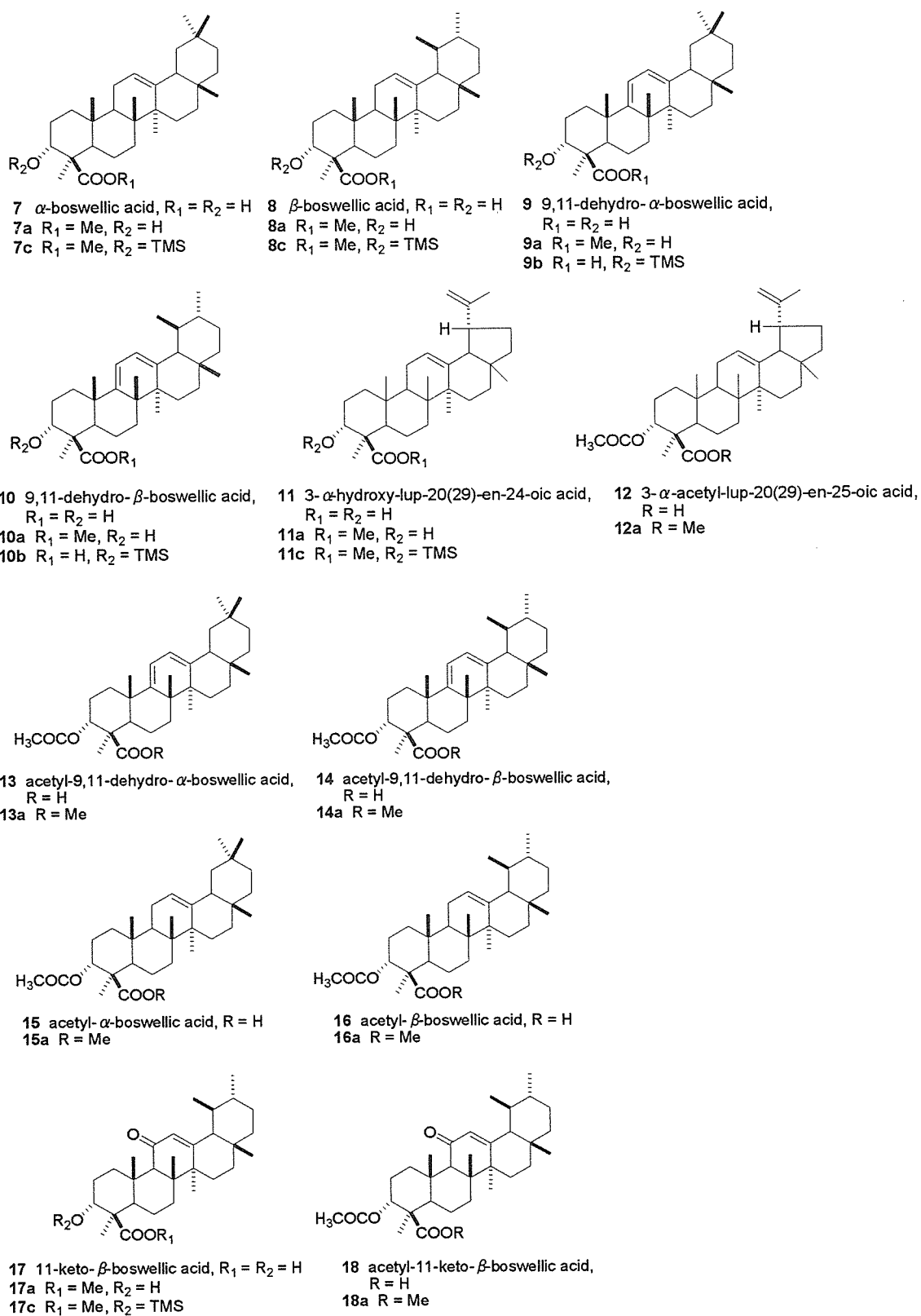


Fig. 8 ニュウコウの構成成分

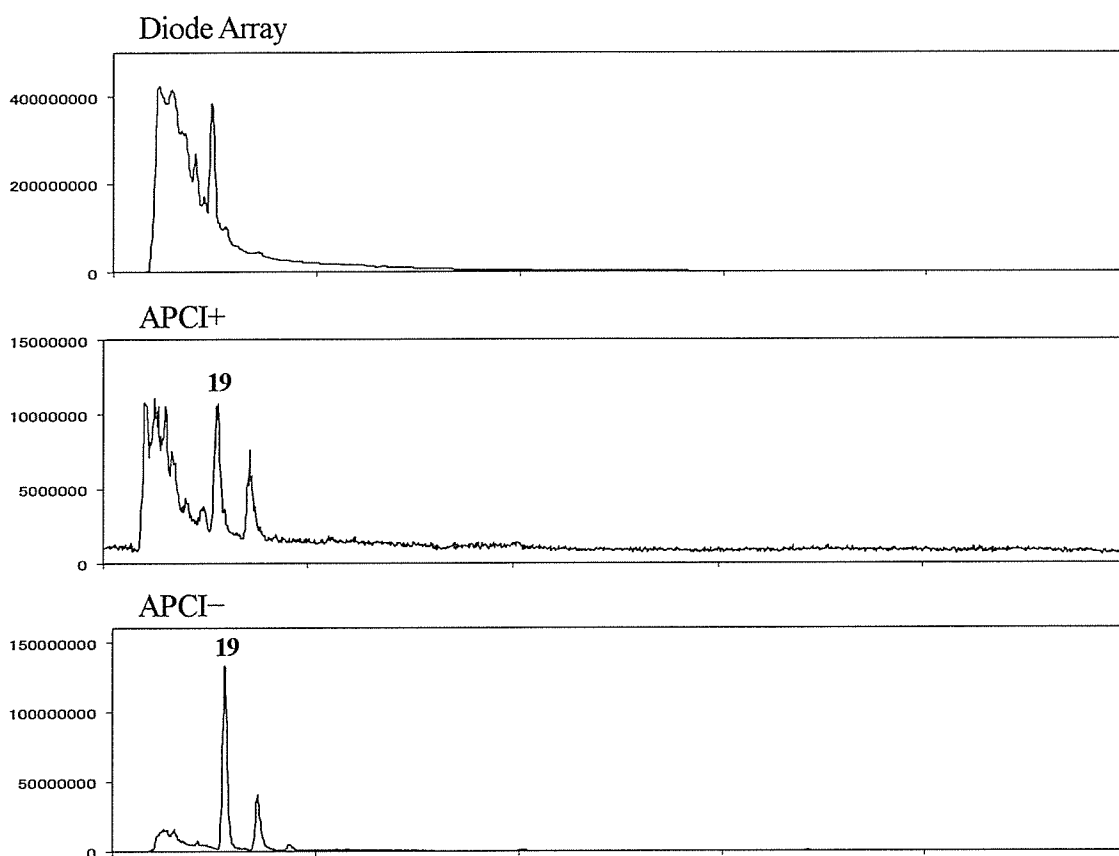


Fig. 9 ベンゾインガムの LC/MS 分析

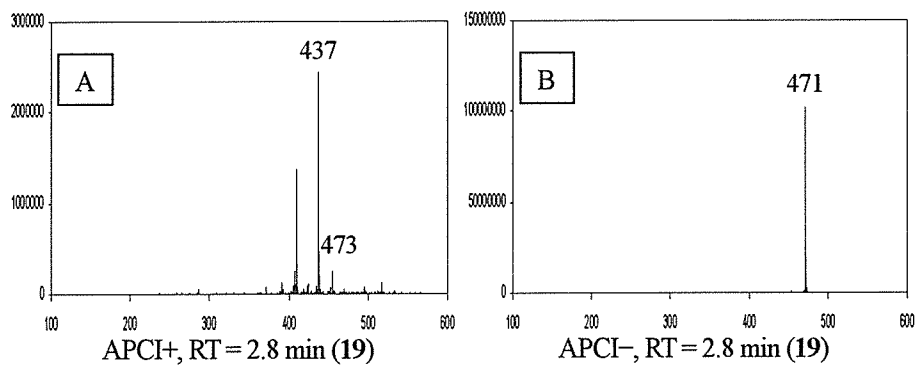


Fig 10 ベンゾインガムの LC/MS 分析

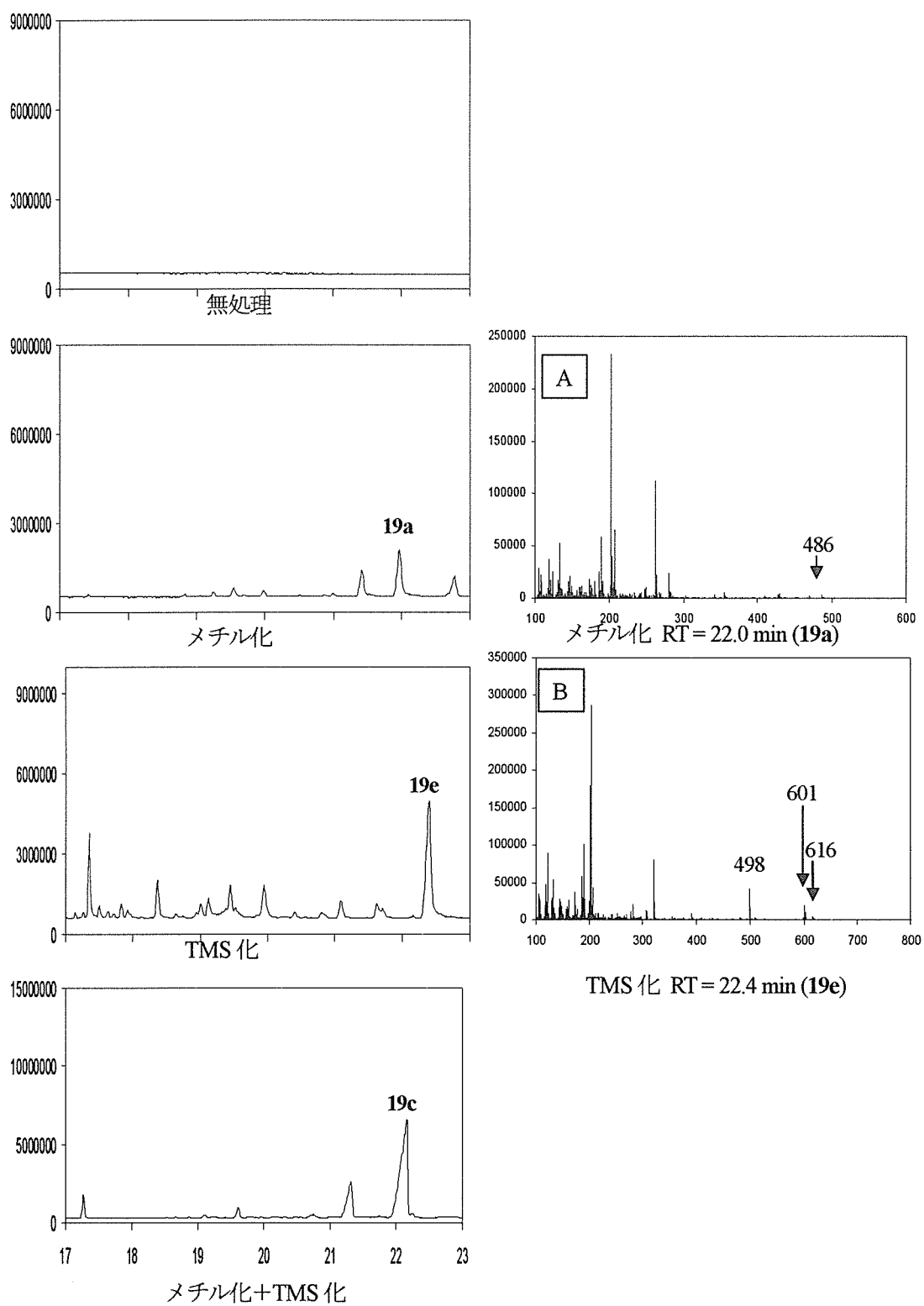
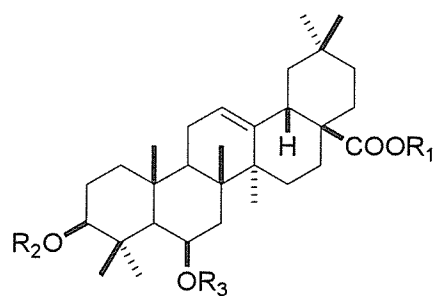


Fig. 11 ベンゾインガムの GCMS 分析



- 19** sumaresinolic acid, $R_1 = R_2 = R_3 = H$
19a $R_1 = Me, R_2 = R_3 = H$
19c $R_1 = Me, R_2$ and $R_3 = H$ and TMS
19e $R_1 = H, R_2 = R_3 = TMS$

Fig. 12 ベンゾインガムの構成成分