

を測定し、検量線を作成した。試料溶液、標準溶液ともに3回測定し、その平均値から定量値 (catechin 換算値) を求めた。

C. 研究結果および考察

1. GPC 分析

分子量標準試料の分析を行った結果、polystyrene standard の保持時間は MW 580: 8.16 min, MW 1310: 7.73 min, MW 2970: 7.18 min, MW 5030: 6.86 min, MW 10700: 6.37 min, MW 19900: 6.02 min となり、流速が 0.3 mL/min であるため、それぞれの保持容量 (VR) は 2.45, 2.32, 2.15, 2.06, 1.91, 1.81 mL となった。Polystyrene standard の分子量の常用対数 (log MW) と保持容量 (VR) から検量線 (Fig. 2) $[\log MW = -2.34VR + 8.52]$ を求め、各保持容量 (1.5 mL から 0.03 mL 刻み) での分子量を算出した。保持容量 t (mL) における UV 強度を At とした場合、数平均分子量は $\sum At / (\sum At / MW)$ 、重量平均分子量は $\sum (At \times MW) / \sum At$ 式で算出される。ブドウ果皮抽出物の高分子量画分を分析して得られたチャートを数値化し (Table 1)、同式を適応して計算した結果、本画分の数平均分子量は 5999.6、重量平均分子量は 21287.7 であった。

2. プロアントシアニジン量の測定

23 年度の検討から、ブドウ果皮抽出物製品中にはプロアントシアニジンが主に含有することが示唆された。そこで、ブドウ果皮抽出物の簡便な定量法として、プロアントシアニジンを指標とした適用の可能性を検討した。

手法として、バニリン、硫酸を加えて呈色させる方法を用いた。また抽出、乾固、再溶解等の前処理操作の少ない、簡便な方法の適用を目指した。これらを考慮して、赤米に含まれるプロアントシアニジンを測定した報告を参考に、ブドウ果皮抽出物での検討を実施した。ブドウ果皮抽出物をメタノール中で攪拌し、1% (v/v) バニリン/メタノール溶液、25% (v/v) 硫酸/メタノール溶液をそれぞれ加えて攪拌後、遠心分離し、上清を試料溶液とした。試料溶液の吸光度 (500 nm) を測定し、標準溶液の (+)-Catechin 溶液の検量線 (Fig. 3) から、試料中のプロアントシアニジン量を求めた。ブドウ果皮抽出物 2 ロットについて測定した結果、プロアントシアニジン量が、62.1, 60.7% という結果が得られた。また、他の参考試料として、縮合型タンニンの含有が知られている柿皮抽出物について、本方法で測定した結果、3.9% であった。このように、測定可能であることが示唆された。

D. 結論

既存添加物名簿に記載されている製造用剤「ブドウ果皮抽出物」の品質規格作成のための化学的検討として、ブドウ果皮抽出物製品中の縮合型タンニンオリゴマー画分について、GPC による平均分子量を求めた。その結果、数平均分子量は 5999.6、重量平均分子量は 21287.7 であった。また、プロシアニジン系タンニンが多く含まれることから、ブドウ果皮抽出物製品中のプロアントシアニジンの簡便測定法について検討したところ、バニリン、硫酸を加えて呈色させ、吸光度測定することで測定可能であることが明らか

となった。この方法を適用し、catechin 換算で 2 製品を定量分析した結果、約 60%の含有率が算出され、測定可能であることが示唆された。

E. 参考文献

- 1) (独) 農業・食品産業技術総合研究機構：
<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/karc/2004/konarc04-22.html>
- 2) Tanaka, T., Nakashima, T., Ueda, T., Tomii, K., Kouno, I. Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC. Chem. Pharm. Bull. 2007: 55, 899-901.

F. 研究業績

1. 論文発表
準備中
2. 学会発表
 - 1) 好村守生, 天倉吉章, 山上沙織, 吉田隆志, 杉本直樹, 山崎 壮, 穠山 浩, 既存添加物「ブドウ果皮抽出物」の成分研究, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

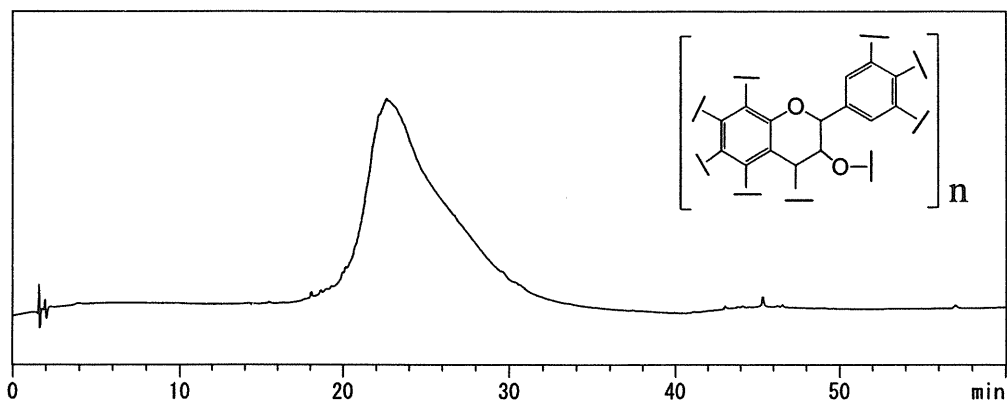


Fig. 1. 水分画物由来フラクションの HPLC クロマトグラム

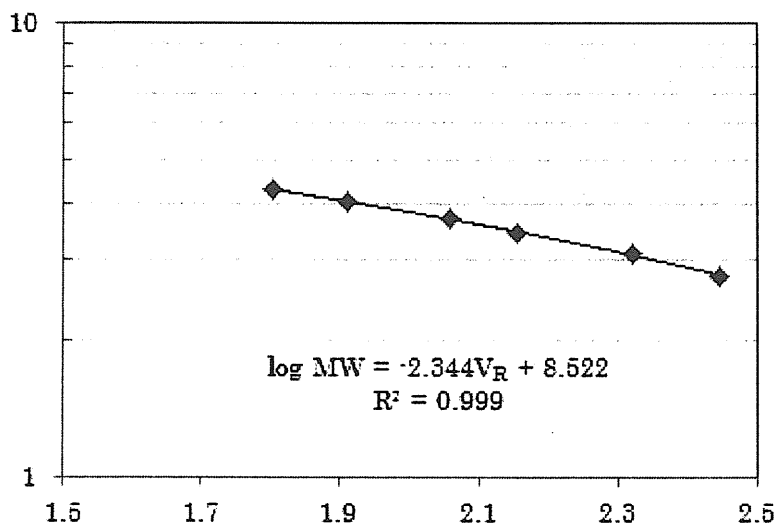


Fig. 2. Polystyrene 分子量標準から得られた検量線

Table 1. ブドウ果皮抽出物の高分子量画分の分析データ

V_R	MW	min	MW	A_c (mm)	A_c/MW	$A_c \times MW$
1.5	101625	5.0	101601	0	0	0
1.53	86435	5.1	86415	1	0.000011572	86415
1.56	73516	5.2	73499	6	0.000081634	440993
1.59	62528	5.3	62513	19.5	0.000311935	1219003
1.62	53182	5.4	53169	42	0.000789931	2233106
1.65	45233	5.5	45222	64	0.00141524	2894210
1.68	38473	5.6	38463	79	0.002053937	3038555
1.71	32722	5.7	32714	84	0.00256773	2747953
1.74	27831	5.8	27824	82.5	0.002965063	2295482
1.77	23672	5.9	23665	79	0.003338236	1869550
1.8	20134	6.0	20128	74.5	0.003701317	1499534
1.83	17124	6.1	17119	69	0.004030502	1181243
1.86	14565	6.2	14561	62.5	0.004292398	910039
1.89	12388	6.3	12384	56	0.00452187	693518
1.92	10536	6.4	10533	50	0.004746899	526660
1.95	8961	6.5	8959	43	0.004799748	385229
1.98	7622	6.6	7620	37	0.00485581	281930
2.01	6483	6.7	6481	31.5	0.004860496	204146
2.04	5514	6.8	5512	27.5	0.004988991	151584
2.07	4690	6.9	4688	23.5	0.00501254	110174
2.1	3989	7.0	3987	20.5	0.005141074	81744
2.13	3393	7.1	3391	17	0.005012552	57655
2.16	2886	7.2	2885	15	0.005200095	43268
2.19	2454	7.3	2453	13.5	0.005502547	33121
2.22	2087	7.4	2087	12	0.005750707	25040
2.25	1775	7.5	1775	10.5	0.005916152	18635
2.28	1510	7.6	1510	9.5	0.006293375	14340
2.31	1284	7.7	1284	8	0.006231032	10271
2.34	1092	7.8	1092	7.5	0.006868174	8190
2.37	929	7.9	929	7	0.007536818	6501
2.4	790	8.0	790	6.5	0.008228361	5135
2.43	672	8.1	672	6	0.008930201	4031
2.46	572	8.2	571	5.5	0.0096246	3143
2.49	486	8.3	486	5	0.010287267	2430
2.52	414	8.4	413	5	0.012095115	2067
2.55	352	8.5	352	4.5	0.012798601	1582
				ΣA_c	$\Sigma (A_c/MW)$	$\Sigma (A_c \times MW)$

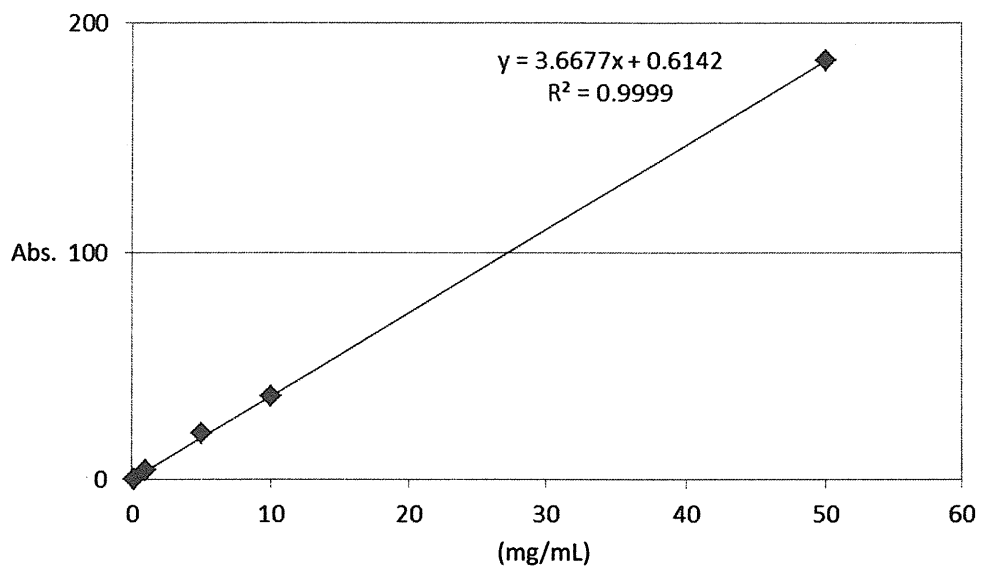


Fig. 3. (+)-Catechin の検量線

Table 2. 試料中のプロアントシアニジン量

	1	2	3	% (mg/100mg)	SD
Lot.1	63.5	62.7	60.1	62.1	1.8
Lot. 2	60.6	62.1	59.5	60.7	1.3
柿皮(70% Acetone EXT)	4.1	4.3	3.4	3.9	0.5

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）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 24 年度分担研究報告書

既存添加物ゲンチアナ抽出物の成分研究

分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨

ゲンチアナ抽出物は「リンドウ科ゲンチアナの根または根茎より、水またはエタノールで抽出して得られたもの」とされ、その有効成分はゲンチオピクロシドおよびアマロゲンチンであるとされる。本研究では、既存添加物名簿に記載されている「ゲンチアナ抽出物」の品質規格作成のための化学的検討として、本抽出物製品中の含有成分について検討を行った。予備的な検討として製品試料溶液を HPLC 分析したところ複数の明瞭なピークが観察されたため、その詳細を明らかにする目的で、各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、9 種の化合物 (anofinic acid, 2-methoxyanofinic acid, 5-hydroxymethyl-2-furfural, 2,3-dihydroxybenzoic acid, furan-2-carboxylic acid, loganic acid, gentiopicroside, isovitexin, sweroside) を単離、構造決定した。本製品中には gentiopicroside, loganic acid, sweroside が主成分として認められたが、既報で主成分として知られている amarogentin は現在までの検討においては単離されてこなかった。現在、その他未同定ピークについての解析を継続中である。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 助教

A. 研究目的

苦味料等として既存添加物名簿収載品目リストに記載されているゲンチアナ抽出物は「リンドウ科ゲンチアナの根または根茎より、水またはエタノールで抽出して得られたもの」とされ、基原・製法・本質には、「リンドウ科ゲンチアナ (*Gentiana lutea* LINNE) の根又は根茎より、水又はエタノールで抽出

して得られたものである。有効成分はゲンチオピクロシド (ゲンチオピクリン) 及びアマロゲンチンである」と記されている。既存添加物の多くは植物抽出物であり、多数の成分が含まれているため、その品質管理には詳細な成分解析に基づいた規格作成が必要である。そこで本研究では、ゲンチアナ抽出物製品中の含有成分を精査することによる品質規格作成のための基礎的な化学データの集積を目的とした検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

試料となるゲンチアナ抽出物は日本食品添加物協会を通じて入手した。分離、精製に使用したカラム充填剤は、YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシィ), Sephadex LH-20 (GE ヘルスケア・ジャパン), Chromatorex ODS (富士シリシア) で、その他の試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。標品として用いた化合物は以下の通り [2,3-dihydroxybenzoic acid (和光純薬), 5-hydroxymethyl-2-furfural (Sigma-Aldrich), furan-2-carboxylic acid (東京化成), isovitexin (ナカライテスク)]。

2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu LC-10Avp システム (島津製作所) を使用した。測定条件は以下のとおり。カラム: YMC-pack ODS AQ-3C2 (2.0 I.D. × 150 mm) (ワイエムシィ), カラム温度: 40°C, 流速: 0.25 mL/min, 測定波長: 254 nm, 試料注入量: 3 µL, 移動相: (A) 0.01 M H₃PO₄; 0.01 M KH₂PO₄ (1: 1) 及び (B) メタノール [濃度勾配条件: 0→30 min (B: 0→50%), 30→50 min (B: 50→60%), 50→75 min (B: 0%)].

NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒として acetone-*d*₆, MeOH-*d*₄ を用いた。ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [acetone-*d*₆ (¹H: 2.04 ppm, ¹³C: 29.8 ppm), MeOH-*d*₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm) を基準とした。

高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用し、測定溶媒に MeOH あるいはアセトニトリルを用いた。

3. 化合物の単離

ゲンチアナ抽出物に水を加えて水溶液とし、それに *n*-ヘキサン, 酢酸エチル, *n*-ブタノールを加えて順次分配を行い、各分画物を得た。それらのうち *n*-ヘキサン分画物については分取 TLC を、酢酸エチルおよび *n*-ブタノール分画物については各種カラムクロマトグラフィー [YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20, Chromatorex ODS] による分離・精製を繰り返すことで化合物の単離を行った。抽出、分画のフローチャートを図 1 に示す。得られた各化合物については順相, 逆相 HPLC での標品との直接比較あるいは文献値との NMR データ等の比較によって同定した。

C. 研究結果

1. 添加物製品の分析

ゲンチアナ抽出物製品をメタノールに溶解させて HPLC 分析を行ったところ、図 2 (a) に示すクロマトグラムが得られた。これらピークを同定する目的で、液-液分配による分画物を調製し、各エキスを得た (*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, *n*-ブタノール, 水分画物)。それらについても HPLC 分析を行い、図 2 (b~e) に示すクロマトグラムが得られた。

2. 化合物の単離・精製

ゲンチアナ抽出物 (40.0 g) に水 (1 L) を加えて溶解させ、*n*-ヘキサン (3 L), 酢酸エ

チル (3 L), *n*-ブタノール (3 L) で順次抽出を行い, 各分画物 [*n*-ヘキサン分画物 (97.2 mg), 酢酸エチル分画物 (989.5 mg), *n*-ブタノール抽出物 (3.8 g), 水分画物 (33.8 g)] を得た. そのうち *n*-ヘキサン分画物 (95.0 mg) について, 分取 TLC (展開溶媒, *n*-ヘキサン: 酢酸エチル: ギ酸, 4:2:1) を行い, anofinic acid (1)¹⁾ (3.9 mg), 2-methoxyanofinic acid (2)¹⁾ (4.3 mg) を得た. また, 酢酸エチルおよび *n*-ブタノール分画物について各種カラムクロマトグラフィー [YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20, Chromatorex, Silica gel] による分離精製を繰り返し, 酢酸エチル分画物 (760.1 mg) から 5-hydroxymethyl-2-furfural (3)²⁾ (14.2 mg), 2,3-dihydroxybenzoic acid (4) (1.0 mg), furan-2-carboxylic acid (5) (4.3 mg), gentiopicroside (6)³⁾ (73.2 mg), isovitexin (7)⁴⁾ (4.5 mg) を, *n*-ブタノール分画物 (2.0 g) からは loganic acid (8)¹⁾ (26.7 mg), gentiopicroside (6) (155.8 mg), sweroside (9)⁵⁾ (9.3 mg) を単離・同定した. 各化合物の同定は NMR データ等の文献値との比較または順相, 逆相 HPLC での標品との直接比較によって行った (化合物 1-9).

- 1: anofinic acid
- 2: 2-methoxyanofinic acid
- 3: 5-hydroxymethyl-2-furfural
- 4: 2,3-dihydroxybenzoic acid
- 5: furan-2-carboxylic acid
- 6: gentiopicroside
- 7: isovitexin
- 8: loganic acid
- 9: sweroside

各化合物の構造式を図 3 に示す. 以下に各

化合物の機器分析データを記す.

Anofinic acid (1): ¹H-NMR (acetone-*d*₆+D₂O) δ: 7.76 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, H-2), 7.66 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3), 6.44 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-1'), 5.78 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-2'), 1.40 (6H, s, H-5',6').

2-Methoxyanofinic acid (2): ¹H-NMR (acetone-*d*₆+D₂O) δ: 7.58 (1H, s, H-6), 6.49 (1H, s, H-3), 6.38 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-1'), 5.65 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-2'), 3.92 (3H, s, 2-OMe), 1.39 (6H, s, H-4',5'). ¹³C-NMR (acetone-*d*₆+D₂O) δ: 164.5 (C-7), 161.4 (C-2), 159.1 (C-4), 131.3 (C-6), 129.7 (C-2'), 121.5 (C-1'), 115.0 (C-5), 112.3 (C-1), 100.9 (C-3), 78.4 (C-3'), 56.6 (2-OMe), 28.4 (2C, C-4',5').

5-Hydroxymethyl-2-furfural (3): ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 9.53 (1H, s, -CHO), 7.37 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-3), 6.57 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-4), 4.60 (2H, s, -CH₂OH). ¹³C-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 179.4 (-CHO), 163.2 (C-5), 153.9 (C-2), 124.7 (C-3), 110.9 (C-4), 57.6 (-CH₂OH).

2,3-Dihydroxybenzoic acid (4): ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 7.34 (1H, dd, *J* = 1.5, 8.0 Hz, H-6), 6.97 (1H, dd, *J* = 1.5, 8.0 Hz, H-4), 6.71 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-5).

Furan-2-carboxylic acid (5): ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 7.69 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-5), 7.16 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-3), 6.56 (1H, dd, *J* = 1.5, 3.0 Hz, H-4).

Gentiopicroside (6): ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 7.44 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-3), 5.75 (1H, ddd, *J* = 6.5, 10.0, 17.0 Hz, H-8), 5.65 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-1), 5.61 (1H, m, H-6), 5.19-5.25 (2H, m, H-10), 5.07 (1H, dt, *J* = 1.0, 1.0, 17.5 Hz, H-7), 4.98 (1H, dd, *J* = 3.5, 17.5 Hz, H-7), 4.65 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Glc H-1), 3.89 (1H, dd, *J* = 2.0, 12.0 Hz, Glc H-6), 3.65 (1H, dd, *J* = 6.5, 12.0 Hz,

Glc H-6), 3.35 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, Glc H-3), 3.29-3.32 (overlapped, H-9, Glc H-3), 3.25 (1H, br t, $J = 9.0$ Hz, H-4), 3.15 (1H, dd, $J = 8.0, 9.0$ Hz, Glc H-2). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 166.3 (C-11), 150.6 (C-3), 135.0 (C-8), 127.0 (C-5), 118.5 (C-10), 117.2 (C-6), 104.9 (C-4), 100.2 (Glc C-1), 98.5 (C-1), 78.4 (Glc C-5), 78.0 (Glc C-3), 74.5 (Glc C-2), 71.5 (Glc C-4), 70.9 (C-7), 62.8 (Glc C-6), 46.6 (C-9).

Isovitexin (7): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2',6'), 6.92 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3',5'), 6.59 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, s, H-8), 4.90 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, Glc H-1), 4.15 (1H, br t, $J = 9.5$ Hz, Glc H-2), 3.87 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.73 (1H, dd, $J = 5.5, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.46-3.48 (2H, m, Glc H-3, 4), 3.42 (1H, m, Glc H-5).

Loganic acid (8): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.38 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3), 5.26 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-1), 4.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc H-1), 4.04 (1H, br t, $J = 5.0$ Hz, H-7), 3.89 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.66 (1H, dd, $J = 5.5, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.37 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, Glc H-3), 3.27-3.31 (overlapped, Glc H-4, 5), 3.19 (1H, dd, $J = 8.0, 9.0$ Hz, Glc H-2), 3.09 (1H, q, $J = 8.0$ Hz, H-5), 2.23 (1H, ddd, $J = 1.5, 6.0, 14.0$ Hz, H-6), 2.02 (1H, dt, $J = 4.5, 9.0, 9.0$ Hz, H-9), 1.87 (1H, m, H-8), 1.65 (1H, m, H-6), 1.09 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-10). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 170.9 (C-11), 152.1 (C-3), 114.2 (C-4), 100.0 (Glc C-1), 97.6 (C-1), 78.3 (Glc C-5), 78.0 (Glc C-3), 75.1 (C-7), 74.7 (Glc C-2), 71.6 (Glc C-4), 62.8 (Glc C-6), 46.5 (C-9), 42.7 (C-6), 42.1 (C-8), 32.1 (C-5), 13.4 (C-10).

Sweroside (9): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.59 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3), 5.56 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-1), 5.53 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-8), 5.31 (1H, dd, $J = 1.0, 17.0$ Hz, H-10), 5.27 (1H, dd, $J = 2.0,$

10.0 Hz, H-10), 4.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc H-1), 4.44 (1H, ddd, $J = 2.0, 4.0, 11.0$ Hz, H-7), 4.36 (1H, dt, $J = 2.5, 11.0, 11.0$ Hz, H-7), 3.89 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.66 (1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.37 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, Glc H-3), 3.32 (overlapped, Glc H-3), 3.27 (1H, dd, $J = 9.0, 10.0$ Hz, Glc H-4), 3.18 (1H, dd, $J = 8.0, 9.5$ Hz, Glc H-2), 3.13 (1H, m, H-5), 2.70 (1H, ddd, $J = 1.0, 5.5, 15.0$ Hz, H-9), 1.77 (1H, m, H-6), 1.70 (1H, dt, $J = 4.5, 12.5, 12.5$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 168.5 (C-11), 154.0 (C-3), 133.3 (C-8), 120.8 (C-10), 106.0 (C-4), 99.7 (Glc C-1), 98.0 (C-1), 78.4 (Glc C-5), 77.9 (Glc C-3), 74.7 (Glc C-2), 71.5 (Glc C-4), 69.7 (C-7), 62.7 (Glc C-6), 43.8 (C-9), 28.5 (C-5), 25.9 (C-6).

また、単離には至っていないが、*n*-ブタノール分画物から quercetin 3'-*O*-methyl ether, quercetin 7-*O*-methyl ether の混合物 (6.5 mg) を得た他、quercetin の di-glucoside と推察される粗フラクションを認めたことから、quercetin の配糖体も複数存在することが伺われた。

D. 考察

今回、ゲンチアナ抽出物製品中の成分としてベンゾピラン誘導体、フラン誘導体、イリドイド配糖体、セコイリドイド配糖体、フラボン配糖体の存在を明らかにした。今回の検討によって本製品溶液中でメインピークとして認められた成分 3 種 (gentiopicroside, loganic acid, sweroside) を明らかにすることができた。一方、有効成分として報告されている amarogentin が単離されてこなかったため、本製品中には微量しか含まれていない可

能性もあるため、今後においても引き続き分離精製を行うとともに、ゲンチアナ抽出物の調製方法による含有成分構成の違いについても検討する予定である。

E. 結論

苦味料等として既存添加物名簿に記載されている「ゲンチアナ抽出物」の品質規格作成に供する化学的検討として、ゲンチアナ抽出物製品中の含有成分について精査した結果、9種の化合物（anofinic acid, 2-methoxy anofinic acid, 5-hydroxymethyl-2-furfural, 2,3-dihydroxybenzoic acid, furan-2-carboxylic acid, loganic acid, gentiopicroside, isovitexin, sweroside）を単離した。そのうち、本製品溶液中で主成分として観察された化合物は gentiopicroside, loganic acid, sweroside の3種であった。一方、ゲンチアナ抽出物の有効成分として知られる amarogentin については、今回の成分精査で単離されなかったことから、引き続き分離精製を行うとともに、有効成分の効率的抽出方法についても検討を行う予定である。

F. 参考文献

- 1) Ando H., Hirai Y., Fujii M., Hori Y., Fukumura M., Niiho Y., Nakajima Y., Shibata T., Toriizuka K., Ida Y. The chemical constituents of fresh Gentian Root. *J. Nat. Med.* 61 (3), 269-279, 2007.
- 2) He K., Li X., Chen H., Yuan L., Deng Y., Chen X., Li X. Separation of two constituents from purple sweet potato by combination of silica gel column and high-speed counter current chromatography. *J. Chromatogr. B*

881-882, 49-54, 2012.

- 3) Inoue H., Ueda S., Nakamura Y. Uber die monoterpenglucoside. X. Secoiridoid-glucoside aus *Swertia japonica*. Isolierung von funf secoiridoid-glucosiden sowie die strukturaufklarung des swerosides, des swertiamarins und des gentiopicrosids. *Chem. Pharm. Bull.* 18, 1856-1865, 1970
- 4) Burret F., Chulia A.J., Debelmas A.M. Study of the genus *Gentiana*: 2"-O-Glucosides of isoorientin and isovitexin in *Gentiana lutea*. *Planta Med.* 36 (2), 178-179, 1979.
- 5) Cambie R.C., Lal A.R., Rickard C.E.F., Tanaka N. Chemistry of Fijian plants. V. Constituents of *Fagraea gracilipes* A. Gray. *Chem. Pharm. Bull.* 38 (7), 1857-1861, 1990.

G. 研究業績

現在のところなし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

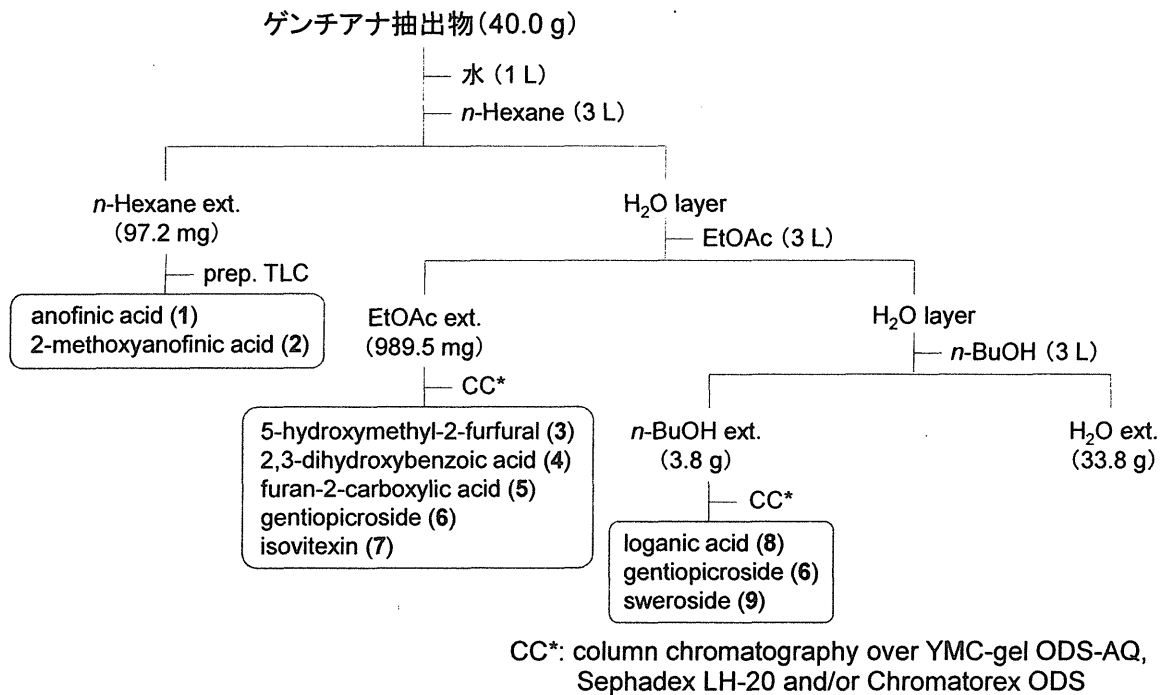


図 1. 抽出, 分画のフローチャート

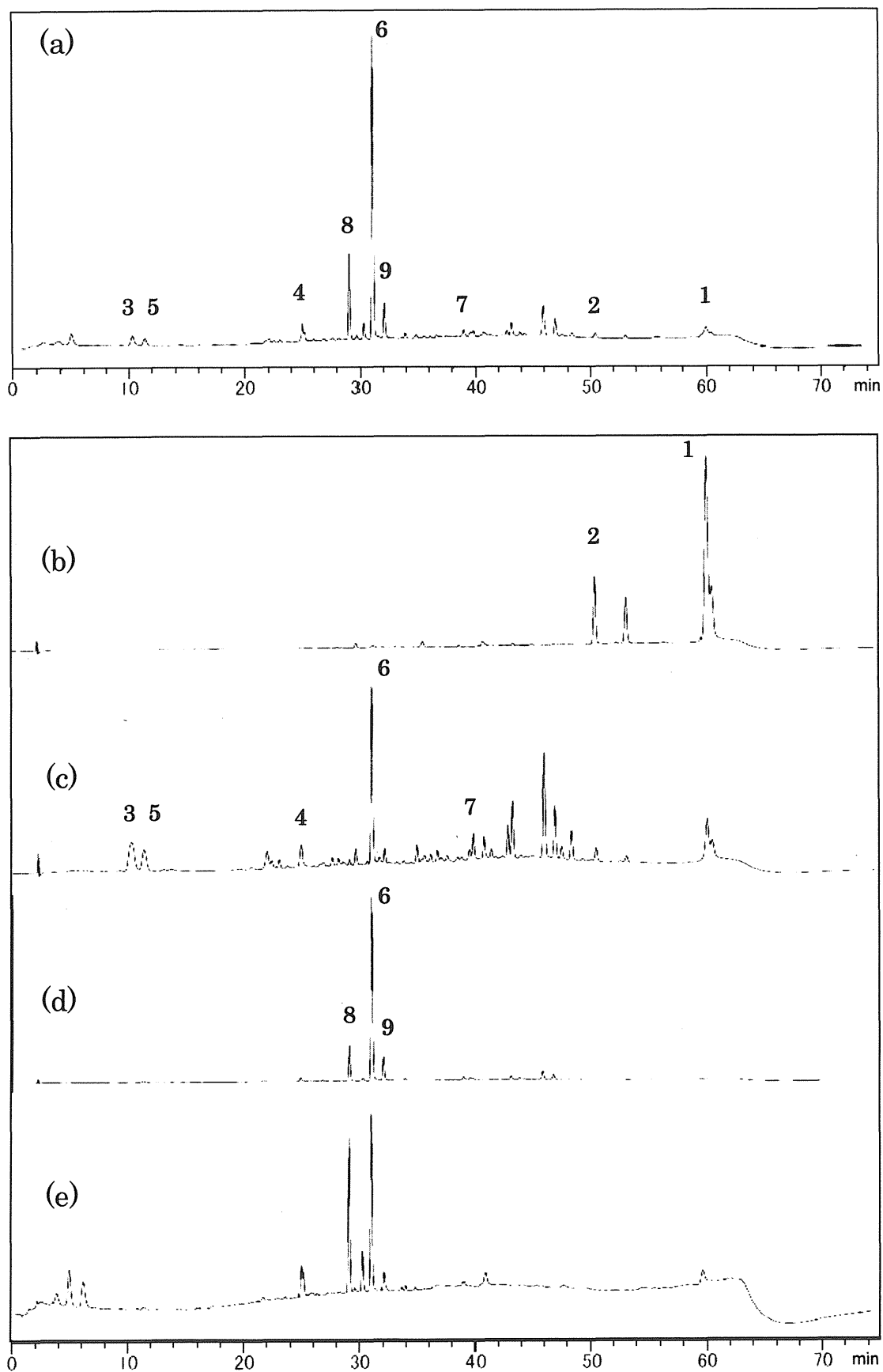


図 2. HPLC クロマトグラム

(a) ゲンチアナ抽出物, (b) *n*-ヘキサン分画物, (c) 酢酸エチル分画物,
 (d) *n*-ブタノール分画物, (e) 水分画物 (各番号は化合物番号を示す)

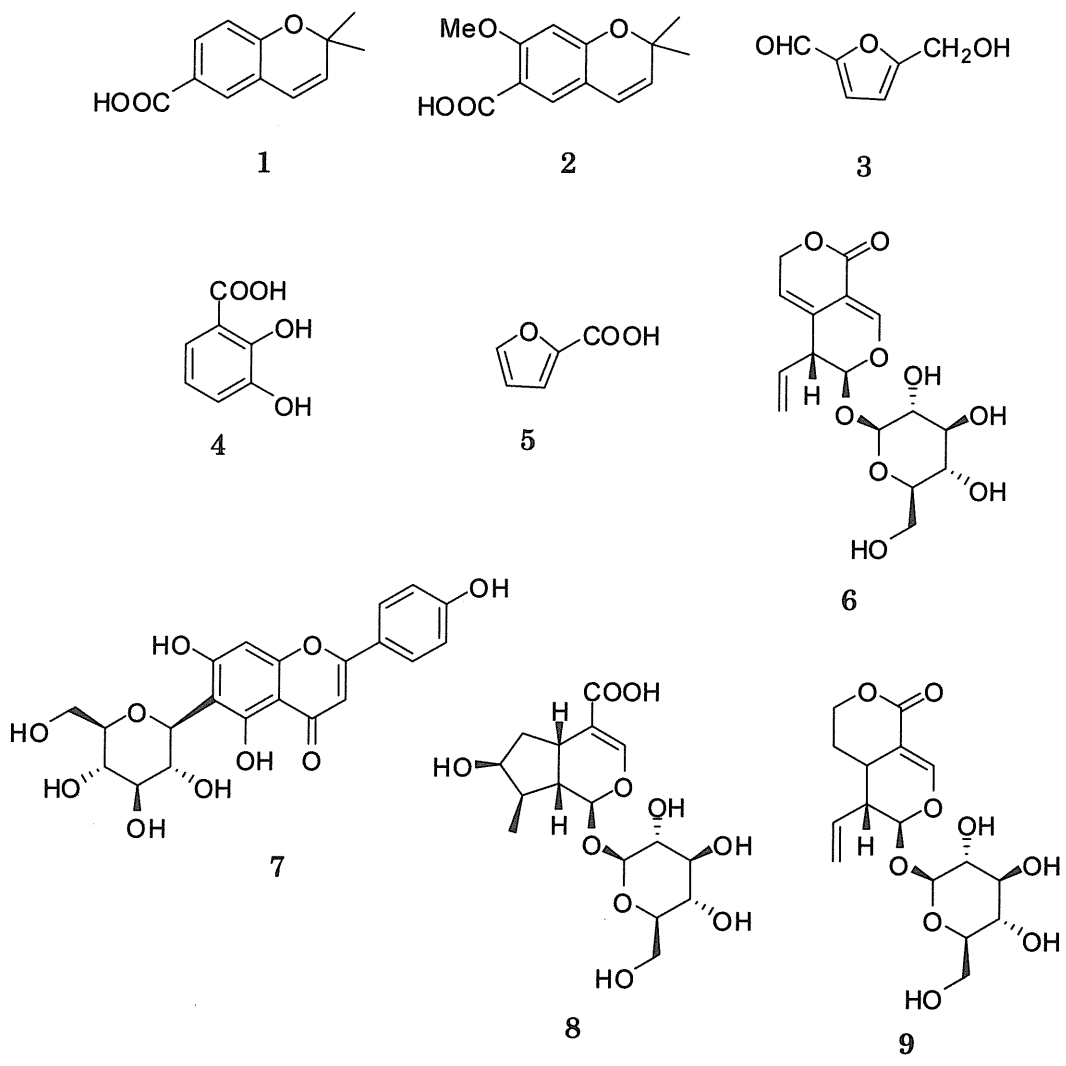


図 3. 化合物 1~9 の化学構造

別添

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 24 年度分担研究報告書

既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分解析と基原の確認

研究協力者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究協力者 石附京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

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

研究要旨 既存添加物製品の基原植物の確認は、品質や安全性確保の上から極めて重要である。既存添加物カンゾウ油性抽出物は、天然由来の酸化防止剤であり、その基原はウラルカンゾウ、チョウカカンゾウ又はヨウカンゾウの根又は根茎と記載されている。本研究では、既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の分析結果から 7 種の指標成分を選択し、カンゾウ油性抽出物流通製品の LC/MS による定量を行った。また既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の NMR 測定データを用いて多変量解析を行い、添加物製品の基原を推定した。

A. 研究目的

既存添加物カンゾウ油性抽出物（英名：Licorice oil extract）は、既存添加物名簿¹⁾に記載されている酸化防止剤の 1 つで、その定義は、『ウラルカンゾウ、チョウカカンゾウ又はヨウカンゾウの根又は根茎から得られた、フラボノイドを主成分とするものをいう。』と記載されている。また、既存添加物名簿収載品目リスト²⁾の基原・製法・本質には、『マメ科ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* FISCHER)、マメ科チョウカカンゾウ (*Glycyrrhiza inflata* BATALIN) 又はマメ科ヨウカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* LINNE) の根又は根茎を水で洗浄した残渣より、室温時～温時エタノール、アセトン又はヘキサンで抽出して得られたものである。主成分はフラボノイドである。』と記載されている。

他にカンゾウ由来の食品添加物としてカンゾウ抽出物（甘味料）があり、既存添加物名簿収載品目リスト²⁾の基原・製法・本質には、『マメ科ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* FISCHER)、マメ科チョウカカンゾウ (*Glycyrrhiza inflata* BATALIN) 又はマメ科ヨウカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* LINNE) の根又は根茎より、熱時水で抽出して得られたもの又は室温時若しくは微温時アルカリ性水溶液で抽出し、精製して得られたものである。主甘味成分はグリチルリチン酸である。』と記載されている。また、生薬カンゾウ（甘草）として、第十六改正日本薬局方に、『本品は *Glycyrrhiza uralensis* Fischer 又は *Glycyrrhiza glabra* Linne (*Leguminosae*) の根及びストロンで、ときには周皮を除いたもの（皮去りカンゾウ）である。本品は定量するとき、

換算した生薬の乾燥物に対し、グリチルリチン酸 ($C_{42}H_{62}O_{16}$:822.93) 2.5%以上を含む。』と記載されている。さらに、化粧品用途として、カンゾウエキス、カンゾウ抽出液、油溶性カンゾウエキスなどがある。既存添加物カンゾウ油性抽出物は、食品添加物公定書未収載の品目であり、今後の規格作成に向け、成分の解明と基原の確認、またその方法の検討が必要である。

本研究では、各種カンゾウ由来試料の LC 分析結果を元に、7 種の指標成分を選択し、カンゾウ油性抽出物流通製品の LC/MS による定量を行った。また既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の NMR 測定データを用いて多変量解析を行い、添加物製品の基原を推定した。

B. 研究方法

B-1. 試料

既存添加物製品及びその配合製剤は、日本食品添加物協会を通じて供与されたカンゾウ油性抽出物 8 製品 KZ01 (*G. inflata* 由来と記載、褐色粉末)、KZ02 (*G. glabra* 由来と記載、褐色塊)、KZ03 (基原植物種記載無し、褐色液体)、KZ04 (*G. glabra* 由来と記載、褐色液体)、KZ05 (*G. glabra* 由来と記載、添加物配合製剤、液体)、及び KZ33~KZ35 (*G. glabra* 由来と記載、褐色粉末または塊) を使用した。カンゾウの根試料としては、製品 KZ01 及び KZ02 の各原料として入手した 2 種 (KZ06、KZ08) と、薬用植物資源研究センター (筑波) より供与された 5 種の基原種のカンゾウ根 (KZ28~KZ32) を使用した。カンゾウを原料とする局方生薬カンゾウ (KZ09~KZ14) 及びカン

ゾウ末 (KZ17) 計 7 製品、市販のカンゾウ製品 (手作り化粧品用素材、ハーブティー、サプリメント、歯磨剤: KZ15、KZ16、KZ18~KZ27) 計 12 製品は購入し、分析に供した。また、カンゾウ油性抽出物との比較のため、既存添加物カンゾウ抽出物 2 製品 (A27、A326) も同様に分析を行った。(Table 1)

B-2. 試薬

カンゾウ中のフラボノイド類 (Fig. 1) 及びサポニン類の定量用標品として、7 種の市販試薬、liquiritin (和光純薬工業(株) 129-05341)、glabridin (和光純薬工業(株) 070-04821)、licochalcone A (SIGMA-Aldrich Co., 68783-10MG)、liquiritigenin (ChromaDex. Co. Ltd., ASB-00012291-010)、isoliquiritigenin (ChromaDex. Co. Ltd., ASB-00009265-005)、glycyrrhizinic acid (和光純薬工業(株) 071-02271) 及び glycyrrhetic acid (和光純薬工業(株) 072-02181) を用いた。

NMR 測定用重溶媒には重メタノール (メタノール- d_4) (Isotec 社製) を用い、内部標準物質として 1,4-BTMSB- d_4 (1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_4) (和光純薬工業(株), 024-17031) を用いた。

上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を使用した。

B-3. 試料溶液の調製

B-3-1. LC/MS 分析用試料溶液の調製

固体試料の KZ01、KZ02、KZ33~KZ35、及び A27 は、0.2 mg/mL の濃度で、液体試料の KZ03~KZ05、KZ18、KZ24 は、1 mg/mL の濃度でそれぞれメタノール溶液を調製し、

10,000rpmで2分間遠心分離した後、上清をLC/MS分析用とした。固体試料のA326は、メタノール不溶物質が認められたため精製水少量に溶解した後、メタノールで希釈して0.2 mg/mLの試料溶液とした(約96%メタノール溶液)。

カンゾウ根等(KZ06~KZ17, KZ19~KZ23, KZ25~KZ32)は、0.5 gをエタノール(99.5%)3 mLに浸し、常温で16h抽出した後、10,000rpmで2分間遠心分離し、上清をメタノールで25倍に希釈し、LC/MS分析用とした。

定量分析はKZ01~KZ05, KZ33~KZ35, KZ09, A27及びA326の11試料に対して行った。検量線の作成には、標品の混合溶液を調製(n=3)して用いた。メタノールを用い、各標品につき0.01~1 µg/mLの範囲に相当する5濃度の混合溶液を調製した。試料中の成分の定量は、各定量対象試料のLC/MS分析用試料溶液を標品の検量線の範囲内に入るよう適宜メタノールで希釈(1~80倍)して測定し、調製液n=3の測定結果を平均して定量値とした。

B-3-2. NMR測定用試料溶液の調製

NMR用重溶媒に溶解するために、固体試料(KZ01, KZ02, KZ33~KZ35)以外の試料は、まず以下の方法で固形分を得た。

KZ03及びKZ04(85%エタノール溶液試料)はエバポレーターで減圧乾固した。KZ05

(76%プロピレングリコール溶液試料)は、同量のベンゼンを用いて液々分配を行い、ベンゼン層をエバポレーターで減圧乾固した。KZ18及びKZ24(ブチレングリコール溶液試料)は凍結乾燥した。カンゾウ根・製品(KZ06, KZ08~KZ17, KZ19~KZ23, KZ25

~KZ32)は、1gを99.5%エタノール6mLで、常温で16h抽出し、遠心分離(10,000rpm, 2分)した上澄をエバポレーターで減圧乾固した。

上記の方法で得られた各試料の固形分は凍結乾燥機で16h乾燥した。予め0.2 mg/mL 1,4-BTMSB- d_4 /メタノール- d_4 溶液を調製し、各試料につき固形分含量が20 mg/mLとなるように加えて溶解した。これらの溶液0.6 mLをNMR管に入れて測定した。各試料ともn=2で調製した。

B-4. 分析方法

B-4-1. LC/MS分析

装置 高速液体クロマトグラフ/質量分析

装置(LC/MS): Waters社製LC/MS system

(LC: Alliance 2695 separations module,

PDA: 2996 photodiode array (PDA)

detector, MS: Quattro microTM)

LC条件 ODSカラム(4.6 x 250 mm, 5 µm,

GL Sciences), カラム温度 30 °C, 流速

1.0 mL/min, 移動相 H₂O : CH₃CN = 7 : 3 (0-3

min) → 2 : 8 (53-60 min), PDA検出器

200-500 nm, 試料導入量 10 µL

MS条件 ソース温度 120 °C, 脱溶媒温度

350 °C, 脱溶媒ガス流量 400 L/hr, Cone

ガス 50 L/hr, キャピラリー電圧 3.0 kV

(ESI pos.), 2.5 kV (ESI neg.), Cone電

圧 40~80 V (Table 2), Scan m/z 100~1000

ただし, glycyrrhizinic acidと

glycyrrhetinic acidの分析は、移動相に

ギ酸を0.05%添加し、カラム温度 35°Cで測定した。

B-4-2. NMR測定と主成分分析

核磁気共鳴装置(NMR) オートサンプラー

付き JNM-ECA600 (600 MHz) (JEOL 社製)。
プローブ : 5mm broadband autotune probe。
NMR 測定条件 定量 NMR (qNMR) 用に最適化した以下の条件を用いた。Spectral width -5~15ppm、data points 49152、auto filter on (filter factor 17)、flip angle 90°、pulse delay 60s (>5*T1)、scan times 8~32、sample no spin、probe temperature room temp. (25°C)、solvent メタノール- d_4 、NMR reference material 1,4-BTMSB- d_4 。ケミカルシフト値は、内標として添加した 1,4-BTMSB- d_4 のピークを 0 ppm とし、 δ 値を ppm 単位で表した。固形分回収量の少なかった KZ18、KZ24、KZ30~KZ32 は、NMR の積算回数を増やした。

主成分分析 解析ソフト Alice 2 for metaborome (JEOL 社製) を用い、4.72~9.50 ppm の範囲について 0.04 ppm 毎にバケット積分した値を変数として使用した。

C. 結果及び考察

C-1. LC/MS による分析と定量

SIR (ES+/ES-)、及び PDA でピークの比較を行い感度の良かった SIR (ES-) での定量値を結果とした。

昨年度の報告以降に追加提供された既存添加物カンゾウ油性抽出物製品 KZ33~KZ35 及びカンゾウの国内標準植物の根 (KZ28~KZ32) のエタノール抽出物の LC/UV クロマトグラムを Fig. 2 及び 3 に示す。*G. glabra* 由来と記載のある KZ33~KZ35、KZ29、KZ31 では、昨年度の報告にあるように peak IX (glabridin (9)) 及び peak X

(hispaglabridin A (10) と推定) が認められた。KZ28 からは、*G. uralensis* に特徴的な peak I~VII、peak XI 及び peak XII が

認められ、KZ30 (*G. echinata*)、KZ32 (*G. pallidiflora*) では、*G. glabra*、*G. uralensis*、*G. inflata* とは異なるクロマトグラムが得られた。

既存添加物製品及び生薬、計 11 製品を用い、各種カンゾウ由来試料の LC 分析結果からカンゾウ由来試料の指標として有効と考えられ、かつ、標品が入手可能であった 7 種の成分を選択し、LC/MS による定量を行った。定量に用いた検量線の相関係数 (R^2) は 0.995 以上と直線性が得られた。各試料の定量の結果 (Table 3)、*G. inflata* 由来と記載の添加物 KZ01 では、licochalcone A の含量が 19.7% と高かった。他の添加物製品では、いずれも glabridin 含量が高かったが、その含有量は 0.79%~28.4% と、製品により差異が認められた。また、比較に用いた既存添加物カンゾウ抽出物とは異なり、既存添加物カンゾウ油性抽出物及びカンゾウ根のエタノール抽出物からは glycyrrhizinic acid はほとんど検出されず、0.3% 未満であった。

C-2. NMR 測定結果を用いた主成分分析

Fig. 4 にカンゾウ油性抽出物製品 (KZ01、KZ34)、及びカンゾウ標準植物の根からのエタノール抽出物の NMR スペクトルを示した。

主成分分析には、積分値への影響を考慮し、抽出溶媒のエタノール、NMR 溶媒由来のメタノールや水のピークと重ならない 4.72~9.50 ppm の範囲のバケット積分値を用いた。主成分分析の結果 (Fig. 5)、大きく 4 つのグループ (それぞれ *G. glabra* 由来、*G. inflata* 由来、*G. uralensis* 由来及びその他の基原種由来と推定される) に分けることができた。既存添加物製品は、*G.*

inflata 由来と記載のある製品以外は全て *G. glabra* 由来と推定されるグループに位置し、基原の記載の無かった製品も *G. glabra* 由来であることが示唆された。また、*G. glabra* 由来と記載のある市販製品で、明らかに *G. uralensis* のグループに分類されるものも認められた。

D. 結論

既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の分析結果から 7 種の指標成分を選択し、カンゾウ油性抽出物流通製品の LC/MS による定量を行った。また既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の NMR 測定データを用いて多変量解析を行い、添加物製品の基原を推定した。

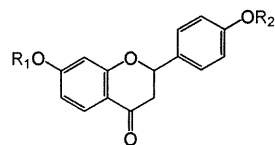
E. 参考文献

1. 厚生省告示第 210 号 “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日 (1996)
2. 厚生省生活衛生局長通知 “別添 1 既存添加物名簿収載品目リスト” (平成 8 年 5 月 23 日) . 衛化第 56 号 (1996)

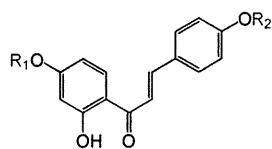
F. 研究発表

1. 論文発表

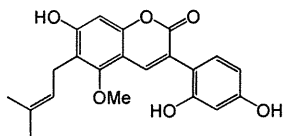
A. Tada, K. Takahashi, K. Ishizuki, N. Sugimoto, T. Suematsu, K. Arifuku, M. Tahara, T. Akiyama, Y. Ito, T. Yamazaki, H. Akiyama and Y. Kawamura, Absolute Quantitation of Stevioside and Rebaudioside A in Commercial Standards by Quantitative NMR, Chem. Pharm. Bull., 61, 33-38 (2012).



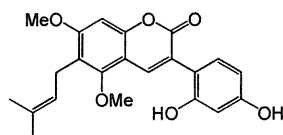
1 Liguiritin ($R_1=H, R_2=Glc$)
4 Liguiritigenin ($R_1=R_2=H$)



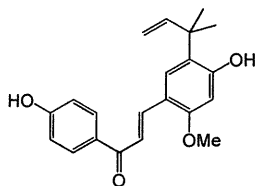
3 Isoliquiritin ($R_1=H, R_2=Glc$)
5 Isoliquiritigenin ($R_1=R_2=H$)
2 Licuraside ($R_1=H, R_2=Api(1\rightarrow2)Glc-$)



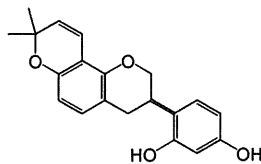
6 Glycycomarin



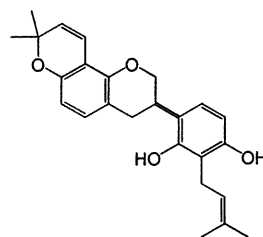
7 Glycyrin



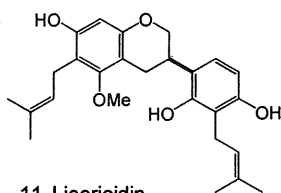
8 Licochalcone A



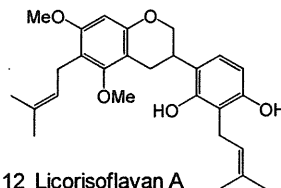
9 Glabridin



10. Hispaglabridin A



11 Licoricidin



12 Licorisoflavan A

Fig.1 カンゾウ中のフラボノイド類

Table 1 各種カンゾウ由来試料

No.	区分	内容	商品記載の植物種
KZ01	食品添加物	カンゾウ油性抽出物	<i>G. inflata</i>
KZ02	食品添加物	カンゾウ油性抽出物	<i>G. glabra</i>
KZ03	食品添加物	カンゾウ油性抽出物	-
KZ04	食品添加物	カンゾウ油性抽出物	<i>G. glabra</i>
KZ33	食品添加物	カンゾウ油性抽出物	<i>G. glabra</i>
KZ34	食品添加物	カンゾウ油性抽出物	<i>G. glabra</i>
KZ35	食品添加物	カンゾウ油性抽出物	<i>G. glabra</i>
KZ05	添加物製剤	カンゾウ油性抽出物製剤	<i>G. glabra</i>
KZ06	KZ01原料	カンゾウ根	<i>G. inflata</i>
KZ07	KZ01原料	カンゾウ根	<i>G. inflata</i>
KZ08	KZ02原料	カンゾウ根	<i>G. glabra</i>
KZ09	局方生薬	カンゾウ	<i>G. uralensis</i>
KZ10	局方生薬	カンゾウ	<i>G. uralensis</i>
KZ11	局方生薬	カンゾウ	<i>G. uralensis</i> / <i>G. glabra</i>
KZ12	局方生薬	カンゾウ	<i>G. uralensis</i> / <i>G. glabra</i>
KZ13	局方生薬	カンゾウ	-
KZ14	局方生薬	カンゾウ	-
KZ15	ハーブティー	カンゾウ根	<i>G. uralensis</i>
KZ16	化粧品用素材	カンゾウ根	-
KZ17	局方生薬	カンゾウ末	-
KZ18	化粧品用素材	カンゾウエキス	<i>G. uralensis</i>
KZ19	サプリメント	カプセル	<i>G. glabra</i>
KZ20	ハーブティー	カンゾウ配合	-
KZ21	ハーブティー	カンゾウ配合	-
KZ22	ハーブティー	カンゾウ根	<i>G. glabra</i>
KZ23	化粧品用素材	カンゾウ根	<i>G. glabra</i>
KZ24	化粧品用素材	カンゾウエキス	-
KZ25	ハーブティー	カンゾウ根	<i>G. glabra</i>
KZ26	ハーブティー	カンゾウ根	<i>G. glabra</i>
KZ27	医薬部外品	菌磨剤	-
KZ28	標準植物	カンゾウ根	<i>G. uralensis</i>
KZ29	標準植物	カンゾウ根	<i>G. glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i> Regel et Herder
KZ30	標準植物	カンゾウ根	<i>G. echinata</i>
KZ31	標準植物	カンゾウ根	<i>G. glabra</i>
KZ32	標準植物	カンゾウ根	<i>G. pallidiflora</i>
A27	食品添加物	カンゾウ抽出物	-
A326	食品添加物	カンゾウ抽出物	-

Table 2 LC/MS定量条件

No.	Compound	Structural formula	Retention time (min)	Mw	SIR測定条件				PDA 検出波長 (nm)
					SIR (ESI+)		SIR (ESI-)		
					(m/z)	Cone volt.	(m/z)	Cone volt.	
1	liquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	4.5	418	419.1	20V	417.2	40V	276
2	licuraside	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	6.5	550	551.2	30V	549.2	50V	
3	isoliquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	8.1	418	419.1	20V	417.2	40V	
4	liquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	12.4	256	257.1	30V	255.1	40V	276
5	isoliquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	20.8	256	257.1	30V	255.1	40V	368
6	glycycomarin	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	27.6	368	369.1	60V	367.1	50V	
7	glycyrin	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	31.5	382	383.1	30V	381.2	50V	
8	licochalcone A	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	32.4	338	339.1	40V	337.2	50V	375
9	glabridin	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	34.6	324	325.1	20V	323.2	40V	281
10	hispaglabridin A	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	39.4	392	393.2	30V	391.2	40V	
11	licoricidin	C ₂₆ H ₃₂ O ₅	41.6	424	425.2	30V	423.3	40V	
12	licorisoflavan A	C ₂₇ H ₃₄ O ₅	52.0	438	439.2	30V	437.2	50V	
13	glycyrrhizinic acid	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	26.0	822	823.3	20V	821.5	60V	252
14	glycyrrhetic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	46.8	470	471.2	40V	469.4	80V	252