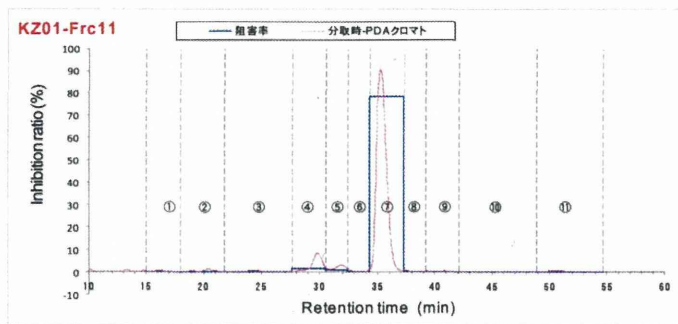
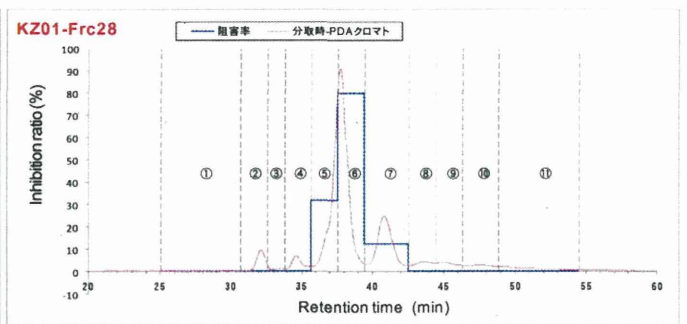


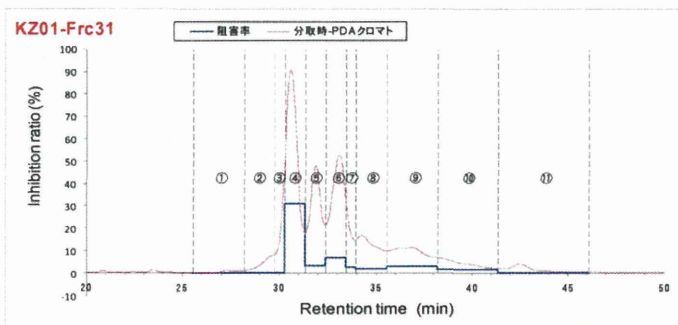
Frc. 11



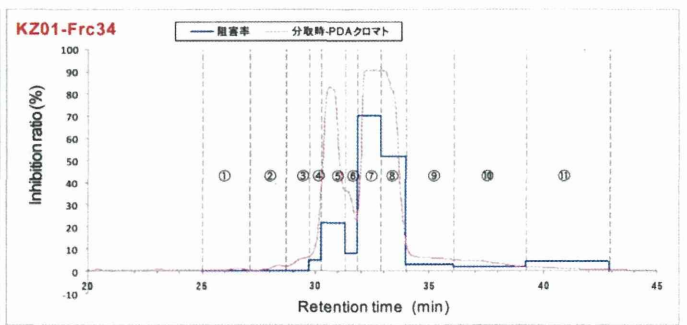
Frc. 28



Frc. 31



Frc. 34



↑ Licochalcone A

Frc. 37&38

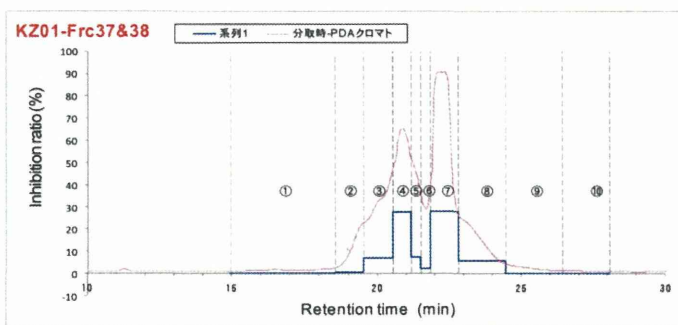
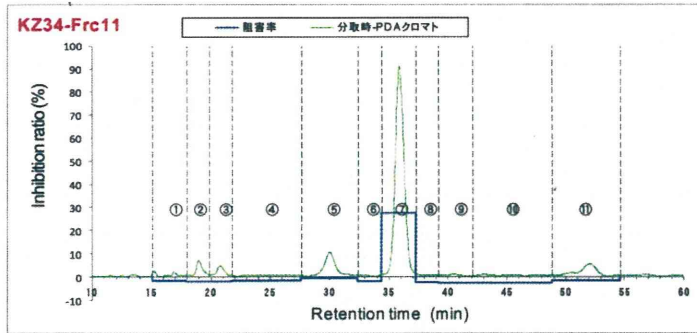
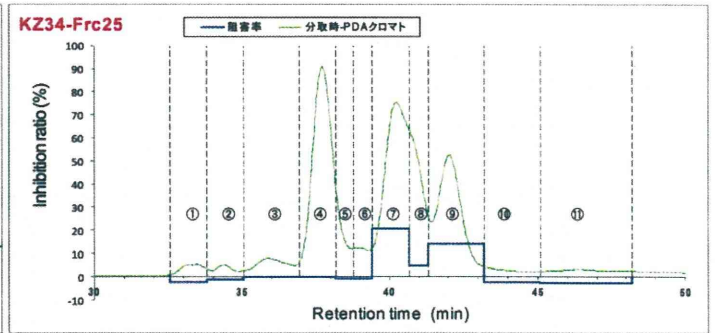


図2 *Glycyrrhiza inflata* 由来カンゾウ油性抽出物製品 (KZ01) の抗酸化活性画分の分離 2 段階目

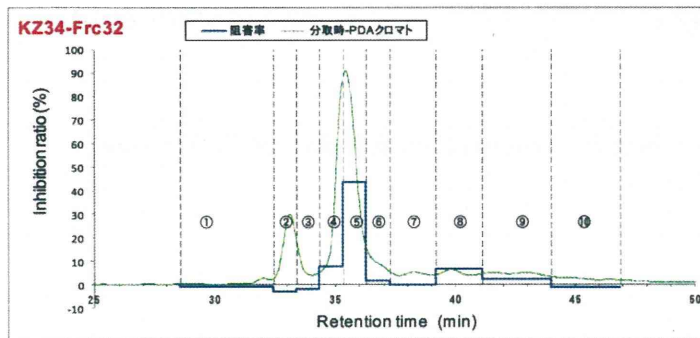
Frc. 11



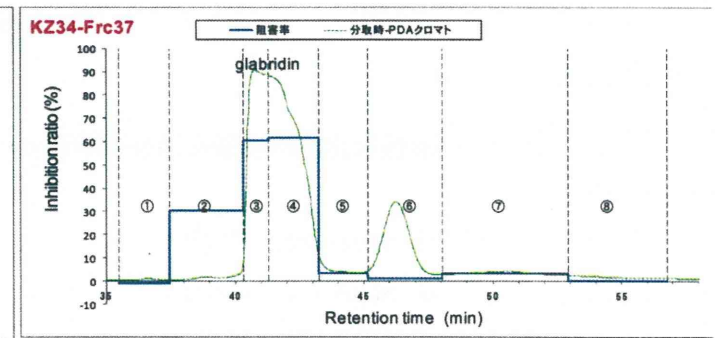
Frc. 25



Frc. 32

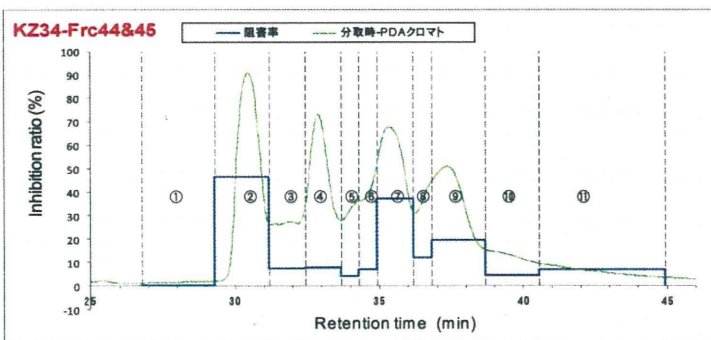


Frc. 37



Glabridin ↑

Frc. 44&45



Frc. 52

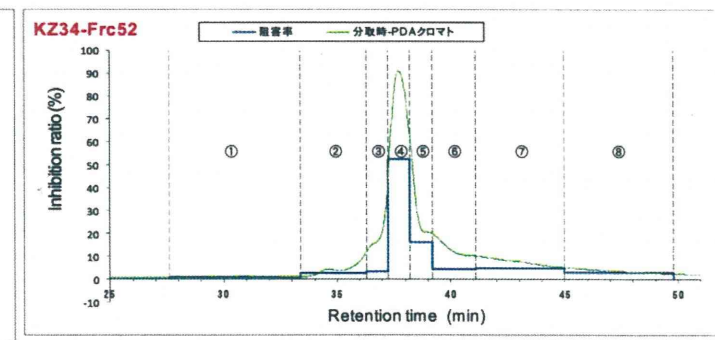


図3 *Glycyrrhiza glabra*由来カンゾウ油性抽出物製品(KZ34)の抗酸化活性画分の分離2段階目

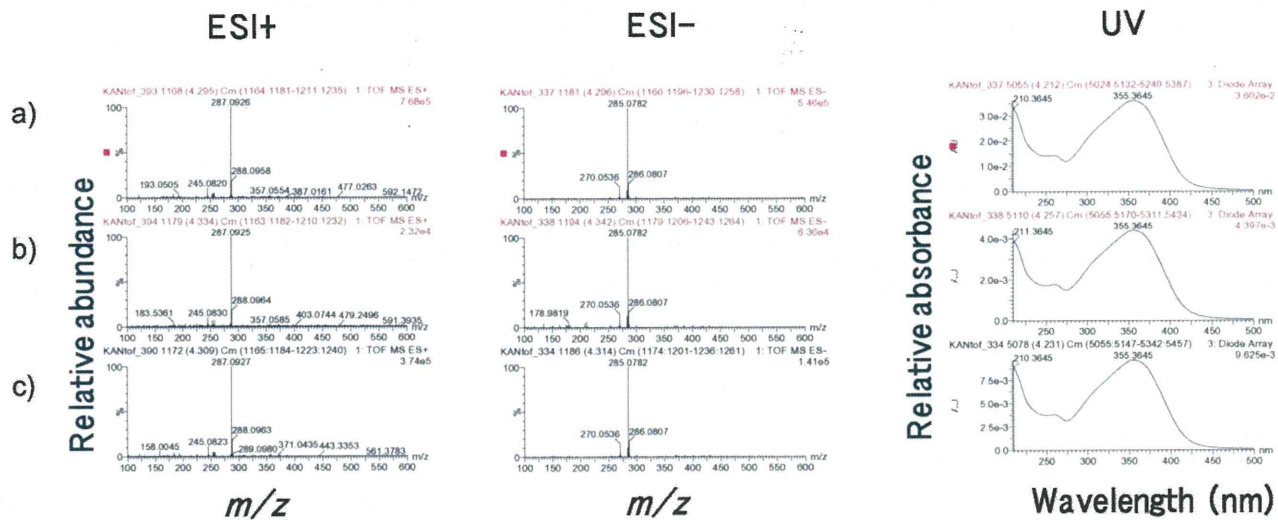


図 4 カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性画分のピーク成分と licochalcone B の MS、UV スペクトル

- a) KZ01-frc. 11-⑦
- b) KZ34-frc. 11-⑦
- c) Licochalcone B

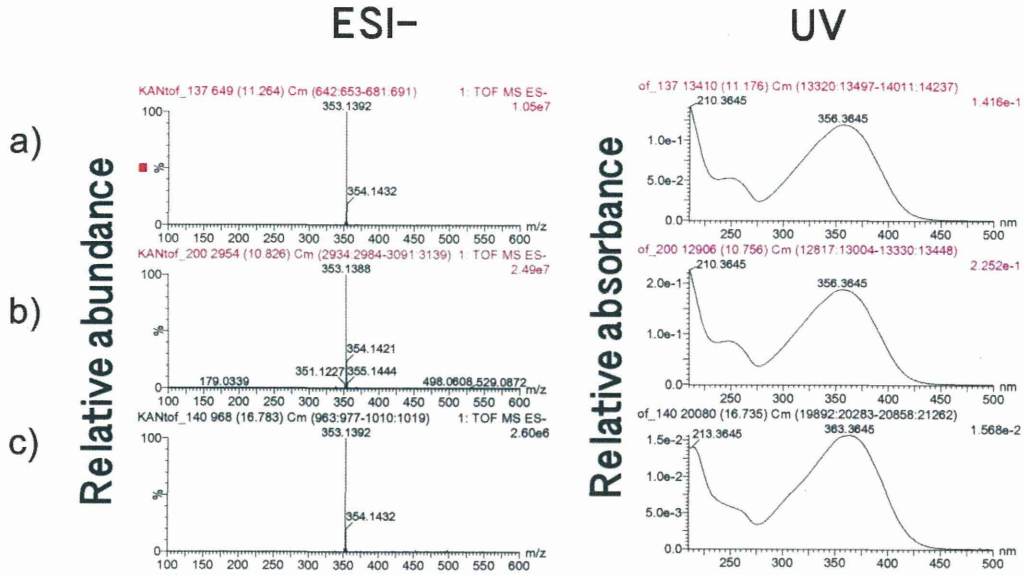


図5 カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性画分のピーク成分と licochalcone D の MS、UV スペクトル

- a) KZ01-frc28-⑥
- b) Licochalcone D
- c) KZ01-frc31-④

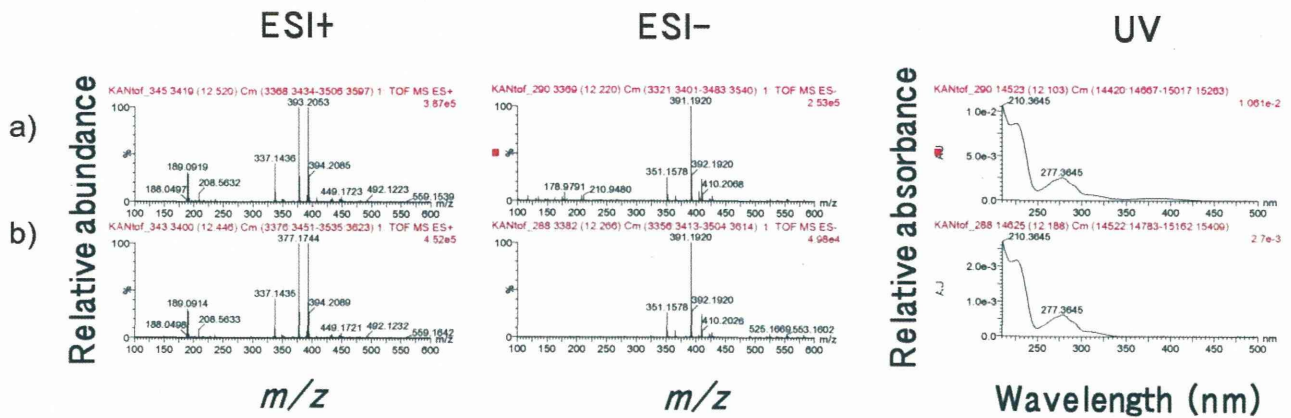


図6 カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性画分のピーク成分と hispaglabridin A の MS、UV スペクトル

- a) KZ34-frc52-④
- b) Hispaglabridin A

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 25 年度分担研究報告書

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

協力研究者 好村 守生 松山大学薬学部 講師

研究要旨

既存添加物名簿記載の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」であり、「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。本研究は、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、昨年度から本抽出物製品中の含有成分についての検討を行っており、今までに 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、そのうち gentiopicroside, loganic acid, sweroside を主成分として報告している。本年度も引き続き成分精査を行った結果、新たに 7 種の既知化合物 [vanillic acid, gentisin, isogentisin, 6'-O-glucosylgentiopicroside, gentisin 7-O-primeveroside, isogentisin 3-O-primeveroside, swertiajaposide D] とともに 1 種の新規化合物 (GL-1 と仮称) を単離し、その構造を明らかにした。また、本製品の詳細な成分精査の結果、既報で有効成分として知られている amarogentin は HPLC 分析においてマイナー成分として検出されるのみであった。

A. 研究目的

既存添加物名簿記載の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、苦味料等として用いられる。また、その基原・製法・本質は、「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」とされる。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。抽出に用いたゲンチアナ（局方品）はウチダ和漢薬社製（Lot: 312424）を用いた。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。また、amarogentin の標品は ChromaDex 社製のものを用いた。

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℃、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、測定溶媒にメタノールあるいはアセトニトリルを用いた。

3. 化合物の単離

23 年度の検討で得られたゲンチアナ抽出物の酢酸エチル、*n*-ブタノールおよび水分画物について、各種カラムクロマトグラフィー [YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20, Chromatorex 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。単離し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。

4. 添加物製品およびゲンチアナ抽出エキスの分析

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。また、ゲンチアナ末（局方品）について、水、熱水、エタノール、50%エタノール、メタノールを用いて各種抽出エキスを調製し、それらについても HPLC 分析を行った。さらに、単離した各化合物についても同条件で分析を行い、各エキス中の化合物組成のプロファイリングを行った。

C. 研究結果

1. 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. そのうち酢酸エチル, *n*-ブタノールおよび水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 gentisin (11) と isogentisin (12) の混合物 (6.5 mg), gentisin 7-*O*-primeveroside (13)¹⁾ (2.6 mg), isogentisin 3-*O*-primeveroside (14)²⁾ (19.9 mg) を, *n*-ブタノール分画物から vanillic acid (10) (4.8 mg), gentisin 7-*O*-primeveroside (13) (5.8 mg), isogentisin 3-*O*-primeveroside (14) (3.7 mg), GL-1 (17) (4.0 mg) を, 水分画物から gentiopicroside (7) (101.9 mg), loganic acid (8) (51.1 mg), sweroside (9) (19.4 mg), 6'-*O*-glucosylgentiopicroside (15)³⁾ (5.4 mg), swertiajaposide D (16)⁴⁾ (10.4 mg) を単離, 同定した. 既知化合物の同定は 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. 本検討で得られた GL-1 (17) と仮称する化合物は文献未記載の化合物であったため, その詳細について次項に示す.

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

- 11: gentisin
- 12: isogentisin
- 13: gentisin 7-*O*-primeveroside
- 14: isogentisin 3-*O*-primeveroside
- 15: 6'-*O*-glucosylgentiopicroside
- 16: swertiajaposide D
- 17: GL-1

各化合物の構造式を図 2 に示す. また, 以下に本年度, 新たに明らかにした各化合物の機器分析データを記す.

Vanillic acid (10): ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 7.55 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2), 7.54 (1H, dd, *J* = 2.5, 8.5 Hz, H-6), 6.83 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 3.89 (3H, s, 3-OMe).

Mixture of gentisin (11) and isogentisin (12); gentisin (11): ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 7.49 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-8), 7.39 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5), 7.31 (1H, dd, *J* = 3.0, 9.0 Hz, H-6), 6.46 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4), 6.26 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 3.88 (3H, s, 3-OMe); isogentisin (12): δ 7.51 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-8), 7.44 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5), 7.37 (1H, dd, *J* = 3.0, 9.0 Hz, H-6), 6.37 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4), 6.21 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 3.86 (3H, s, 7-OMe).

Gentisin 7-*O*-primeveroside (13): ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 7.67 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-8), 7.63 (1H, dd, *J* = 3.0, 9.5 Hz, H-6), 7.58 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-5), 6.61 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4), 6.37 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 4.91 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, Glc H-1), 4.16 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, Xyl H-1), 3.95 (1H, br d, *J* = 10.0 Hz, Glc H-6), 3.86 (3H, s, OMe), 3.70 (overlapped, Xyl H-5), 3.54-3.62 (3H, m, Glc H-5, 6), 3.25-3.33 (3H, m, Glc H-2, 3, Xyl H-4), 3.22 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, Glc H-4), 3.07 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, Xyl H-3), 3.02 (2H, dd, *J* = 7.0, 9.0 Hz, Xyl H-2), 2.97 (2H, t,

$J = 10.5$ Hz, Xyl H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 180.2 (C-9), 167.0 (C-3), 162.6 (C-1), 157.8 (C-4a), 154.1 (C-7), 151.2 (C-10a), 126.1 (C-6), 120.7 (C-8a), 119.7 (C-5), 110.7 (C-8), 104.2 (Xyl C-1), 103.2 (C-9a), 101.5 (Glc C-1), 97.4 (C-2), 93.1 (C-4), 76.5 (Xyl C-3), 76.3 (Glc C-3), 76.1 (Glc C-5), 73.6 (Xyl C-2), 73.4 (Glc C-2), 69.8 (Xyl C-4), 69.7 (Glc C-4), 68.6 (Glc C-6), 65.8 (Xyl C-5), 56.6 (OMe).

Isogentisin 3-*O*-primeveroside (14): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.62 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5), 7.49 (2H, d, $J = 3.0$ Hz, H-8), 7.46 (2H, dd, $J = 3.0, 9.0$ Hz, H-6), 6.76 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-4), 6.47 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-2), 5.02 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, Glc H-1), 4.18 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Xyl H-1), 3.92 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, Glc H-6), 3.85 (3H, s, 7-OMe), 3.72 (1H, dd, $J = 5.5, 11.0$ Hz, Xyl H-5), 3.62-3.68 (overlapped, Glc H-5, 6), 3.26-3.35 (3H, m, Glc H-2, 3, Xyl H-4), 3.20 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, Glc H-4), 3.11 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, Xyl H-3), 2.99-3.05 (2H, m, Xyl H-2, 5). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 180.3 (C-9), 164.4 (C-3), 162.2 (C-1), 157.5 (C-4a), 156.1 (C-7), 150.6 (C-10a), 125.3 (C-6), 120.5 (C-8a), 119.9 (C-5), 105.5 (C-8), 104.4 (Xyl C-1), 103.8 (C-9a), 100.1 (Glc C-1), 99.0 (C-2), 95.0 (C-4), 76.5 (Xyl C-3), 76.3 (Glc C-3), 75.8 (Glc C-5), 73.6 (Xyl C-2), 73.2 (Glc C-2), 69.8 (Glc C-4), 69.7 (Xyl C-4), 69.0 (Glc C-6), 65.8 (Xyl C-5), 56.1 (OMe).

6'-*O*-Glucosylgentiopicroside (15): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.44 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3), 5.76 (1H, ddd, $J = 7.0, 10.5, 17.0$ Hz, H-8), 5.63 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-1), 5.61 (1H, m, H-6), 5.20-5.26 (2H, m, H-10), 4.97-5.08 (2H, m, H-7), 4.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc H-1), 4.37 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc H-1'), 4.16 (1H, dd, $J = 2.0, 11.5$ Hz, Glc H-6), 3.86 (2H, dd, $J = 1.5, 11.5$ Hz, Glc

H-6'), 3.76 (1H, dd, $J = 6.5, 11.5$ Hz, Glc H-6), 3.66 (1H, dd, $J = 5.0, 11.5$ Hz, H-6'), 3.51 (1H, m, Glc H-5), 3.24-3.37 (overlapped, Glc H-3, 3', 4, 4', 5'), 3.21 (3H, dd, $J = 8.0, 9.0$ Hz, Glc H-2'), 3.19 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, Glc H-2).

Swertiajaposide D (16): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 4.44 (1H, m, H-7), 4.36 (1H, dt, $J = 4.5, 10.5, 10.5$ Hz, H-7), 4.27-4.32 (1H, m, H-3), 4.24 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc H-1), 4.18-4.23 (1H, m, H-3), 4.08 (1H, dd, $J = 3.5, 10.5$ Hz, H-1), 3.88 (2H, br d, $J = 11.0$ Hz, Glc H-6), 3.83 (2H, dd, $J = 6.5, 7.5$ Hz, H-8), 3.78 (1H, dd, $J = 4.5, 10.5$ Hz, H-1), 3.63-3.67 (2H, m, Glc H-6), 3.24-3.34 (overlapped, Glc H-3, 4, 5), 3.13 (1H, dd, $J = 8.0, 9.0$ Hz, Glc H-2), 2.81 (1H, m, H-6), 2.34-2.41 (2H, m, H-6, 9), 1.31 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-10). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 165.9 (C-11), 153.4 (C-5), 125.1 (C-4), 104.6 (Glc C-1), 78.2 (Glc C-3), 78.1 (Glc C-5), 74.9 (Glc C-2), 71.8 (C-8), 71.6 (Glc C-4), 67.8 (C-7), 67.6 (C-1), 63.6 (C-3), 62.8 (Glc C-6), 46.5 (C-9), 26.8 (C-6), 19.2 (C-10).

GL-1 (17): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ 7.56 (1H, dd, $J = 1.5, 8.0$ Hz, H-6'), 7.41 (1H, dd, $J = 1.5, 8.0$ Hz, H-4'), 7.39 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-3), 6.88 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 5.47 (1H, br t, H-7), 5.30 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-1), 4.91 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc H-1'), 4.68 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc H-1), 3.90 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.87 (1H, dd, $J = 2.0, 12.5$ Hz, Glc H-6'), 3.69 (1H, dd, $J = 5.0, 12.5$ Hz, Glc H-6'), 3.67 (1H, dd, $J = 5.5, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.52 (1H, dd, $J = 7.5, 9.0$ Hz, Glc H-2'), 3.47 (1H, br t, $J = 9.0$ Hz, Glc H-3'), 3.38-3.41 (2H, m, Glc H-4', 5'), 3.38 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, Glc H-3), 3.27-3.34 (overlapped, Glc H-4, 5), 3.21 (1H, dd, $J = 7.5, 9.0$ Hz, Glc H-2), 3.19 (1H, m, H-5), 2.45 (1H, br dd, $J = 8.0, 14.0$ Hz, H-6), 2.27 (1H, m, H-8),

2.16 (1H, dt, $J = 5.0, 10.0, 10.0$ Hz, H-9), 1.89 (1H, ddd, $J = 5.0, 8.0, 14.0$ Hz, H-6), 1.14 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-10). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ 171.8 (C-11), 170.9 (C-7'), 153.0 (C-2'), 151.7 (C-3), 147.3 (C-3'), 124.5 (C-6'), 123.8 (C-4'), 120.1 (C-5'), 115.0 (C-1'), 114.3 (C-4), 103.1 (Glc C-1'), 100.2 (Glc C-1), 97.4 (C-1), 80.4 (C-7), 78.3, 78.4 (each 1C, Glc C-4, 4'), 78.0 (Glc C-3), 77.7 (Glc C-3'), 74.8, 74.9 (each 1C, Glc C-5, 5'), 62.8 (Glc C-6), 62.5 (Glc C-6'), 47.2 (C-9), 41.2 (C-8), 40.5 (C-6), 33.1 (C-5), 13.8 (C-10).

2. GL-1 (17) の構造解析

GL-1 は淡褐色無晶系粉末として得られ、HR-ESI-MS の測定結果から分子量は $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$ であることが示された。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル (図 3) では loganic acid 由来のシグナルに加えてグルコース 1 つ分のシグナルおよびオルトカップリングした三置換ベンゼンのシグナルが観察された。また、loganic acid の 7 位のプロトンが大きく低磁場シフト ($\delta 4.04 \rightarrow \delta 5.47$) していることが $^1\text{H-}^1\text{H}$ correlation spectroscopy (COSY) (図 4) で示されたことから、この位置がアシル化に関与していることが示唆された。これらの部分構造は、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (図 5) においても loganic acid 由来のシグナル、グルコース 1 つ分のシグナルおよび 2,3-dihydroxybenzoic acid 由来のシグナルが観察されたことから支持された。

本化合物の構造の確証を得る目的で heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) の測定を行った結果、図 6 に示す相関が観察されたことから、各グルコースおよ

びアシル基の結合位置に矛盾が無いことが明らかになった。

以上の諸データより、GL-1 の構造を 17 式に示すように決定した。

3. 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 分析を行った結果、図 7 (a) に示すチャートが得られた。また、液-液分配による分画物を調製し、得られた各エキス (n -ヘキサン、酢酸エチル、 n -ブタノール、水分画物) についての HPLC 分析を行い、図 7 (b~e) に示すクロマトグラムを得た。さらに、今回の成分精査で得られた各化合物を標品として同条件で分析比較を行った結果、本添加物製品中の主成分は gentiopicroside (7), loganic acid (8), sweroside (9) の 3 成分であることが明らかとなった。一方、既報で有効成分として知られる amarogentin はマイナー成分として検出された。

4. ゲンチアナ末 (局方品) の分析

ゲンチアナ末 (局方品) を用いて、既存添加物名簿収載の方法で各種抽出エキスを (水、熱水、エタノール、50%エタノール) 調製し、HPLC 分析を行った [図 8 (A)~(D)]。また、メタノール抽出エキスの調製も行い、それらとの比較を行った [図 8 (E)]。その結果、いずれの抽出エキスについても gentiopicroside (7), loganic acid (8), sweroside (9) を主成分として認めたが、amarogentin は微量しか検出されなかった。

D. 考察

今回の成分精査の結果、キサントン類、キサントン配糖体、イリドイド配糖体を単離するとともに、1種の新規化合物を単離し、その構造を明らかにした。また、HPLCを用いた成分分析において、本製品中の主成分は gentiopicroside, loganic acid, sweroside であることを明らかにした。一方、有効成分として報告されている amarogentin は、本製品中には微量しか含まれていなかった。amarogentin は、ゲンチアナ末（局方品）から調製した各種抽出エキス中にも微量しか検出されなかったことから、このことは調製方法に起因するものではないと考えられる。

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、7種の既知化合物 [vanillic acid, gentisin, isogentisin, 6'-O-glucosylgentiopicroside, gentisin 7-O-primeveroside, isogentisin 3-O-primeveroside, swertiajaposide D] とともに、1種の新規化合物を単離した。また、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、微量しか検出されなかった。このことは、抽出エキスの調製方法の差異によるものではないと考えられる。

F. 参考文献

1) Hayashi T., Yamagishi T., Two xanthone

glycosides from *Gentiana lutea*, *Phytochemistry*, 27 (11), 3696-3699, 1988.

2) Bellmann G., Jacot-Guillarmod A., *Phytochemistry of the genus Gentiana. Flavone and xanthone compounds in Gentiana lutea leaves*, *Helvetica Chimica Acta* 56 (1), 284-294, 1973.

3) Mpondo M. E., Chulia A. J., 6'-O- β -D-glucosyl gentiopicroside: a new secoiridoid from *Gentiana asclepiadea*, *Planta Medica* 54 (2), 185-186, 1988.

4) Kikuchi M., Kakuda R., Yaoita Y., Kikuchi M., New secoiridoid glucosides from *Swertia japonica*, *Helvetica Chimica Acta* 91 (7), 1236-1243, 2008.

G. 研究業績

1. 論文発表

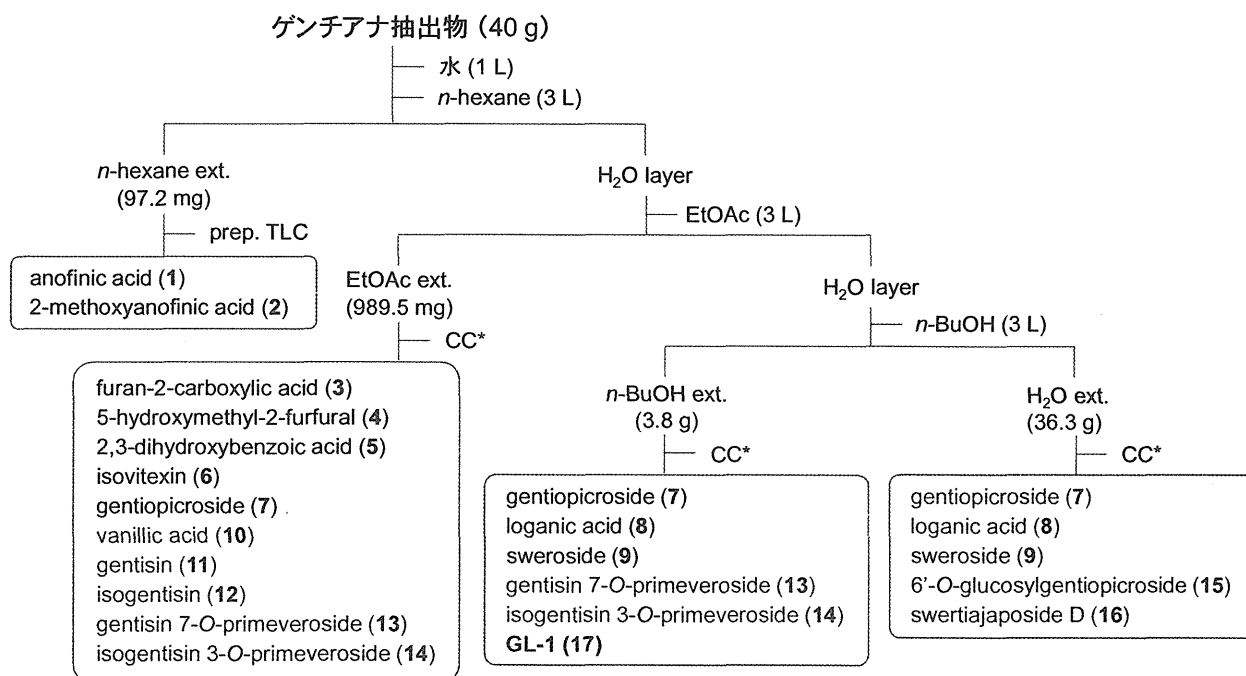
現在のところなし

2. 学会発表

好村 守生, 天倉 吉章, 吉田 隆志, 多田 敦子, 伊藤 裕才, 杉本 直樹, 山崎 壮, 穂山 浩: 既存添加物「ゲンチアナ抽出物」の成分研究. 日本生薬学会第60回年会 (2013.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



CC*: column chromatography over YMC-gel ODS-AQ, Sephadex LH-20 and/or Chromatorex ODS

図 1. 抽出, 分画のフローチャート

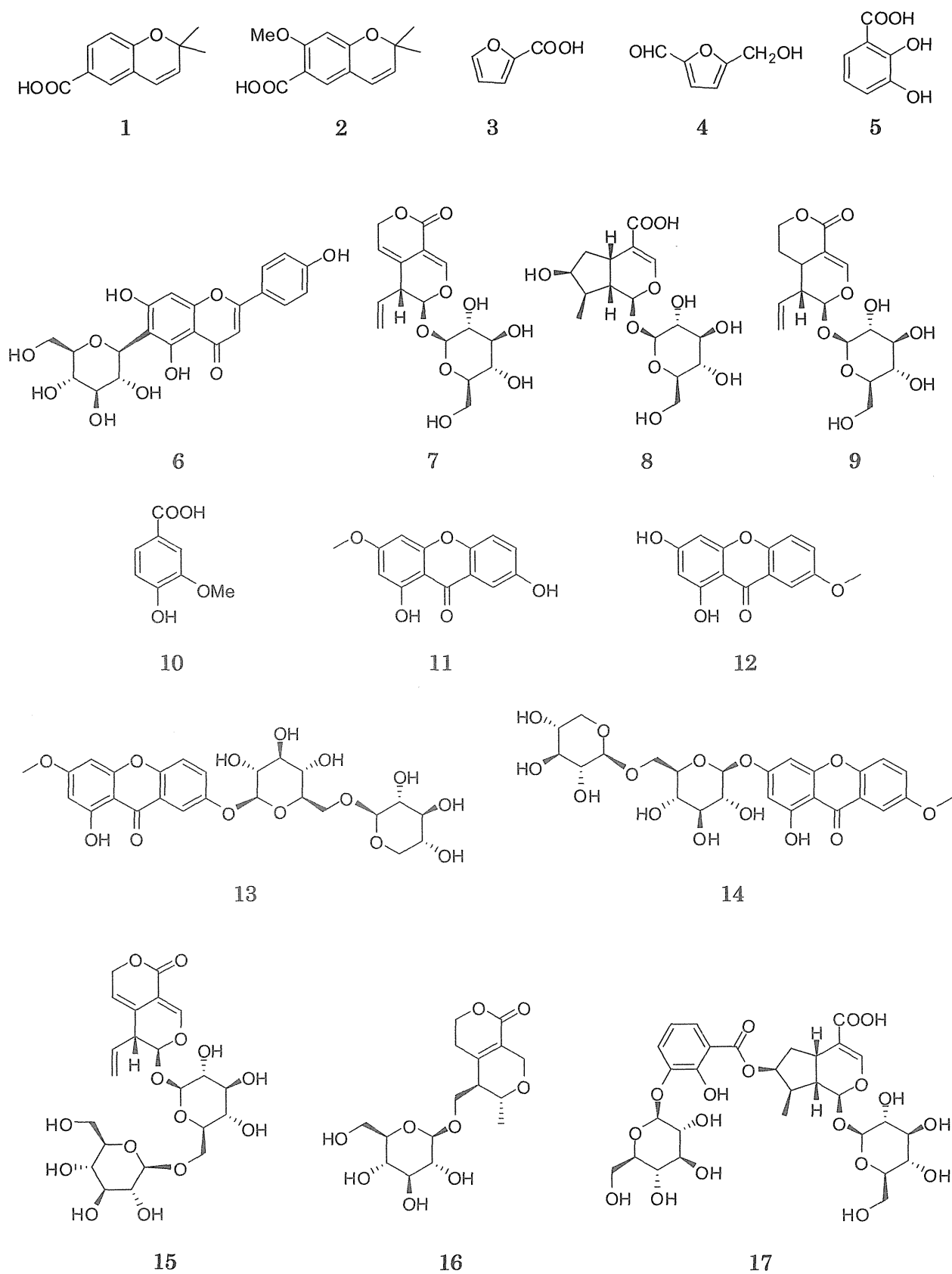


図 2. 化合物 1~17 の化学構造

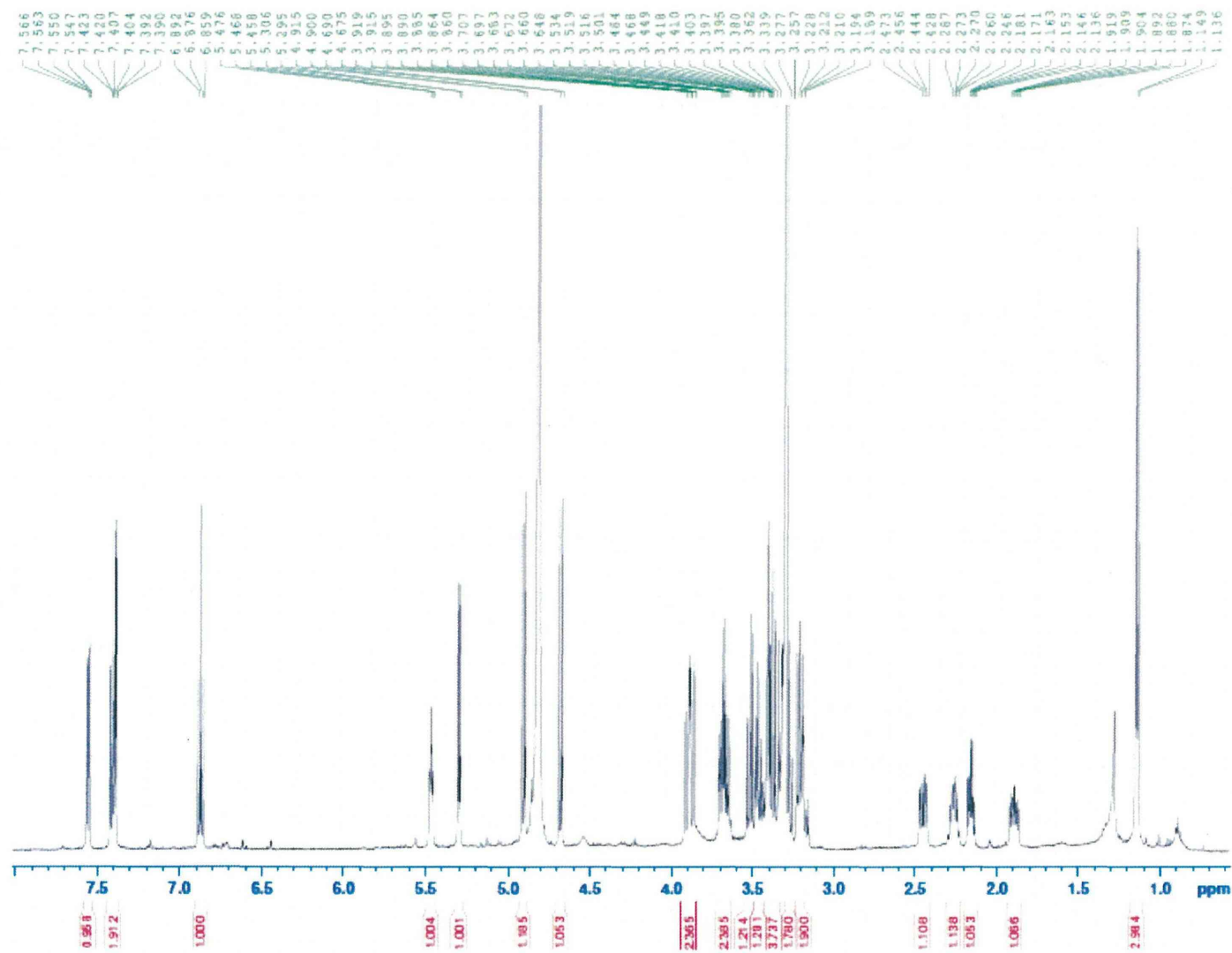


图 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of GL-1 (17)

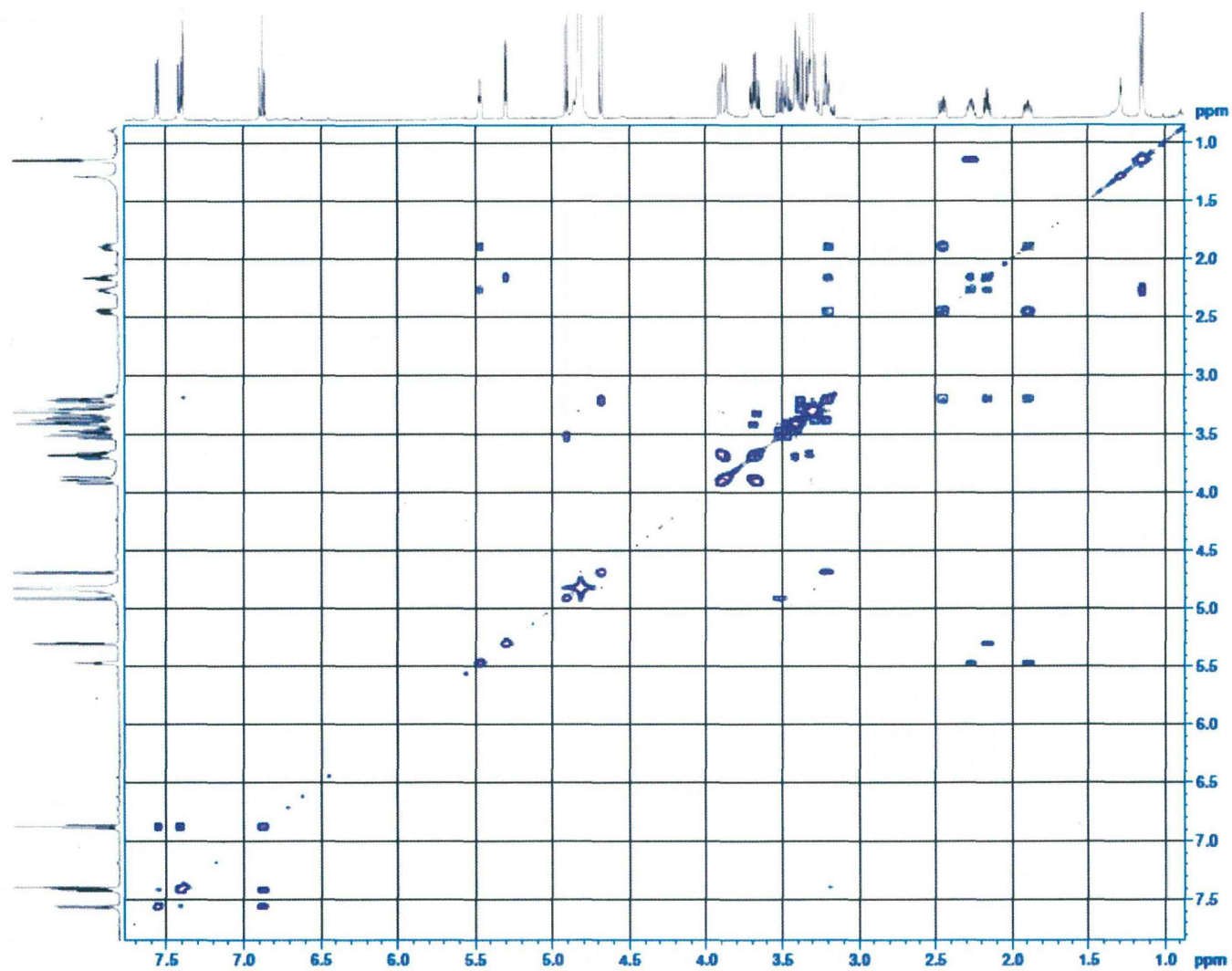


图 4. ^1H - ^1H COSY spectrum of GL-1 (17)

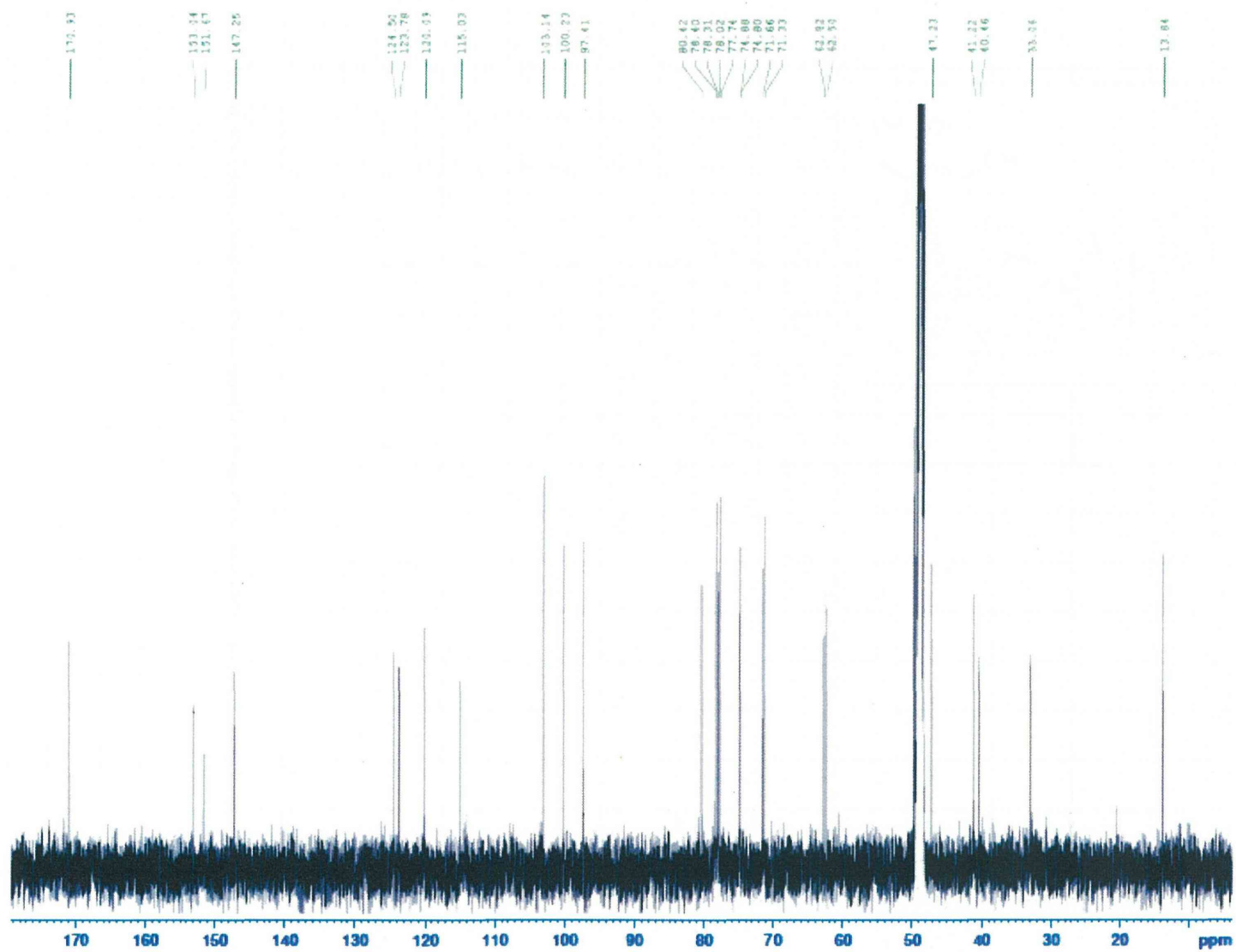


图 5. ^{13}C -NMR spectrum of GL-1 (17)

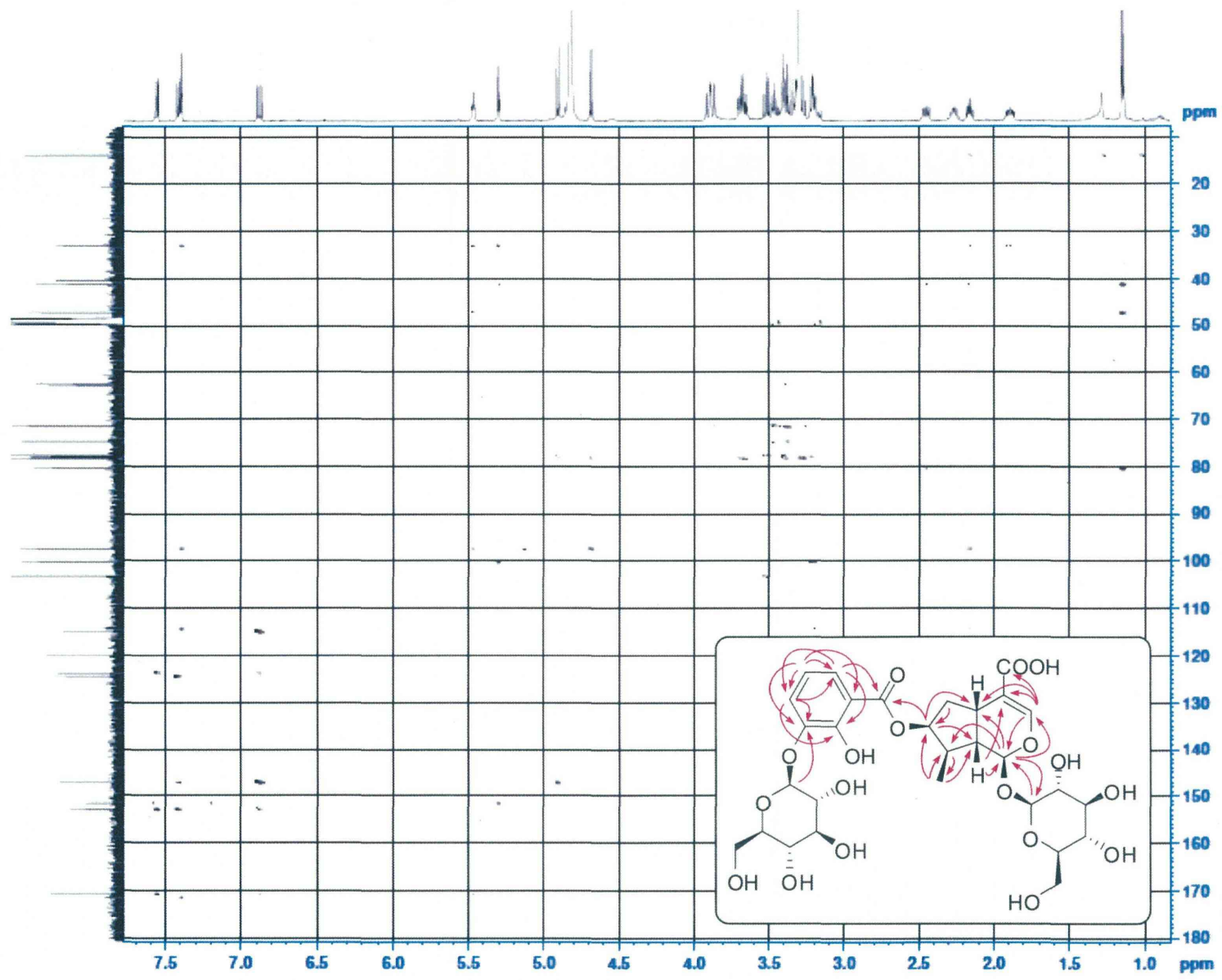


图 6. HMBC spectrum of GL-1 (17)

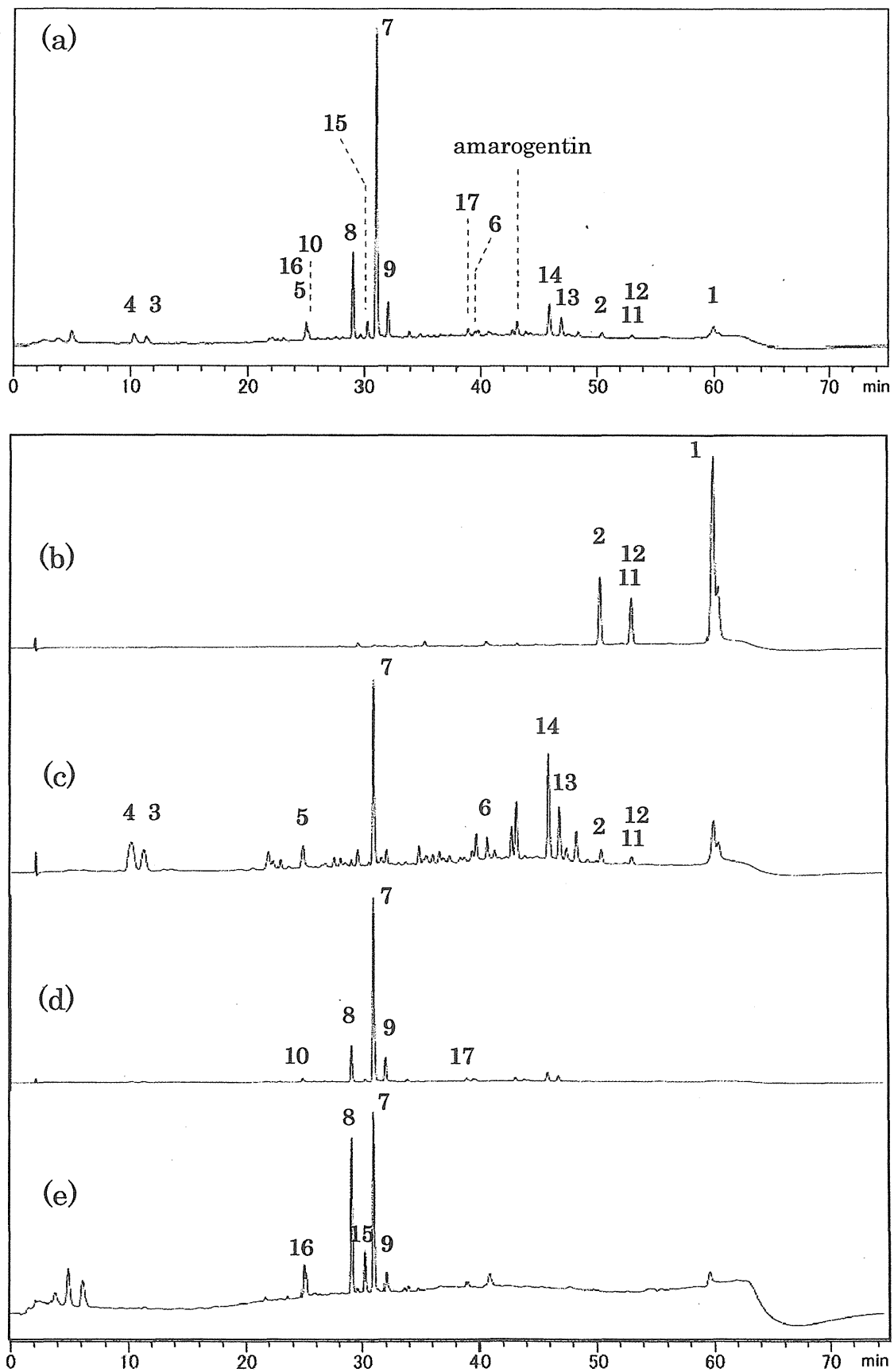


図7. HPLC クロマトグラム (UV 254 nm)

(a) ゲンチアナ抽出物製品, (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)

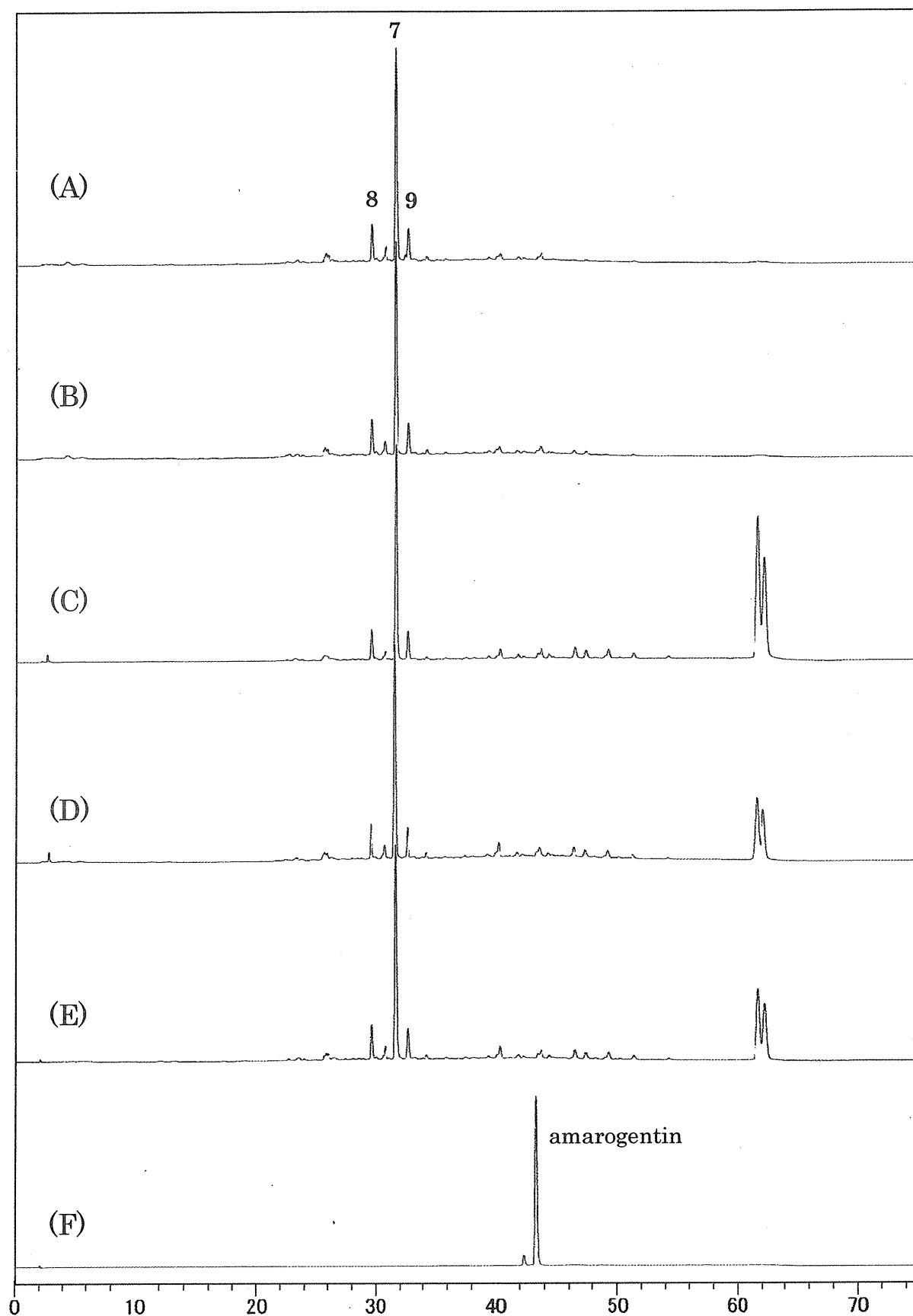


図 8. HPLC クロマトグラム (UV 254 nm)

(A) 水抽出物, (B) 熱水抽出物, (C) エタノール抽出物, (D) 50%エタノール抽出物,
 (E) メタノール抽出物, (F) amarogentin

分担研究課題 定量NMR法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究

分担研究者 水上 元
名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 既存添加物中の指標成分の定量分析への定量NMR法の適用について検討した。本年度は、カンゾウ抽出物中の甘味成分であるglycyrrhizic acidについて、市販標準品の純度をqNMR法によって評価するとともに、カンゾウ抽出物中の含量測定を試みた。

A. 研究目的

¹H-NMRにおけるシグナル面積比は分子中の個々の置換基上のプロトン数に比例している。また、プロトン当たりのシグナル面積は、化合物の種類によらずにその濃度に比例している。これらの特性を利用した定量NMR (qHNMR: proton-specific quantitative NMR) 法は、(1) クロマトグラフ法と異なり、検量線を作製する必要がないため、測定対象化合物の標準物質がなくても測定が可能である、(2) 内部標準物質として絶対純度が保証された認証標準物質を用いることによって、対象とする化合物の絶対純度が決定できる、という大きなメリットを有している。¹⁾

本研究は、このような特徴に着目して、qHNMR法を既存添加物中の指標成分の定量に応用することを目的として実施している。本年度は、天然甘味料として用いられるカンゾウ抽出物に含まれる甘味成分であるglycyrrhizic acidについて、市販試薬の純度の評価を行った。また、同法を利用してカンゾウ抽

出物中のglycyrrhizic acid含量を直接定量することを試みた。

B. 研究材料と方法

化合物

定量 NMR 用 基準 物質 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate-*d*₆ (DSS-*d*₆)は和光純薬から購入した。その他の試薬は、すべて市販品を用いた。

Glycyrrhizic acid 市販試薬の純度の検定

Glycyrrhizic acid 約5.00mgを正確に秤取り、DSS-*d*₆ (Wako TraceSure-grade) を0.500 mg/mlの濃度で含むDMSO-*d*₆溶液の1.00 mlに溶解した。この溶液の0.6 mlを用いてNMRを測定した。

カンゾウ抽出物中のglycyrrhizic acidの定量

カンゾウ抽出物の約10.0mgを正確に秤取り、glycyrrhizic acid標準品と同様にしてNMRを測定した。

NMR装置と測定条件

¹H-NMR スペクトルの測定には Bruker Avance 600を用いた。NMRの測定は、杉本らの報告¹⁾に準じて行なった。

HPLCによるglycyrrhizic acidの測定

Glycyrrhizic acid標準品約1.00mgを5.00 mlのエタノールに溶解したものを、HPLC用標準液とした。HPLC分析の条件は、第16改正日本薬局方所収の方法²⁾に従って行った。

C. 結果と考察

1. qHNMR法によるglycyrrhizic acidの市販試薬の純度の検定

(1) Signalの選定

Glycyrrhizic acidの約5.00mgをDSS-*d*₆ (Wako TraceSure-grade) を0.500 mg/mlの濃度で含むDMSO-*d*₆溶液の1.00 mlに溶解し、NMRを測定した(図1)。NMRスペクトルからは、9位(2.36 ppm: singlet)、12位(5.42 ppm: doublet)、1'位(4.43 ppm: doublet)、1''位(4.52 ppm: doublet)の水素に由来するシグナルが明瞭に観察された。このうち、もっとも低磁場側に観測されるH12シグナルを指標として用いることとした。

(2) Glycyrrhizic acid市販試薬の純度評価

種々の供給元から入手した10種のglycyrrhizic acid試薬について、H12由来のシグナルを指標として純度を測定した(表1)。その結果、その純度は62~89%の範囲にあり、特にカタログ上での純度が90%以上の試薬では、その提示純度と比較してqHNMR純度は低くなった。

(3) Glycyrrhizic acid試薬のqNMR純度とHPLCピーク面積の相関性

qHNMR法による純度評価を行ったglycyrrhizic acid試薬について、0.200 mg/ml溶液

を作成し、その10 μlを用いてHPLCで分析した時のglycyrrhizic acidに相当するピークの面積とqHNMR法によって求めた純度の相関性を検討した(図2)。その結果、両者は高い相関性を示していた。

2. qHNMR法によるカンゾウ抽出物中のglycyrrhizic acid含量の測定

カンゾウ抽出物中のglycyrrhizic acid含量をqHNMR法を用いて直接測定することを試みた。まず、各種のカンゾウ抽出物について、その10 mgをDSS-*d*₆を含むDMSO-*d*₆溶液に溶解してNMRを測定した。その結果、医薬品製造原料として用いられるカンゾウ抽出物ではglycyrrhizic acidのH12由来のシグナルが明瞭に分離したピークとして観察され、これを利用した定量が可能であったが、既存添加物製品であるA27、A29、A326では、他のシグナルと重なったり、ベースラインのゆがみが認められ、このシグナルを用いた定量は困難であると思われた(図3)。一方、これらの製品ではH9に由来する2.36 ppmのシグナルは比較的明瞭に観察されたので、このシグナルを用いて、定量を行うことが可能であった。

これらの3つの製品について、第16改正日本薬局方に収載されたHPLC法を用いてglycyrrhizic acid含量を定量したところ、qHNMR法による値とは必ずしも一致せず、後者による定量値が高くなる傾向を示した(表2)。

D. 結論

Glycyrrhizic acidの12位の水素由来のシグナルを用いて市販のglycyrrhizic acid試薬の純度を評価できた。同じプロトンシグナルを用いて、カンゾウ抽出物製品中のglycyrrhizic acid含量を直接定量することを試みたが、夾雑物に由来するシグナルやベースラインのゆがみによって正確な定量は困難であることがわかった。qHNMR