

(4) 既存添加物の品目ごとの基原生物等の調査

第9版食品添加物公定書未収載品目の基原植物、微生物等で既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性の有無についてアンケート調査を実施した。回答があった55社の内7社から、第9版食品添加物公定書収載予定品目を含め9品目(グルコサミン、キチン、キトサン、スフィンゴ脂質、ファフィア色素、トウガラシ水性抽出物、トウガラシ色素、生コーヒー豆抽出物、アグロバクテリウムスクシノグリカン)について改正要望が寄せられた。詳細は、別紙資料5に収載した。

4. 考察

本年度は、既存添加物の中から第10版食品添加物公定書収載をめざし28規格の検証用規格を作成した。また、昨年度報告した検証用規格を含め、一部の品目については裏付け試験を実施した。今後、裏付け試験の結果を踏まえ、更に規格の完成に向けて検討を進める。また、更に検証を実施する品目を増やすための検討を進める。

残された既存添加物については第5版自主規格の作成を目指して検討を行った。このうち26品目は成分規格案の作成ができたが、第4版自主規格に収載したものの中から5品目については見直しに対し、全く情報の収集ができなかった。このためこれらの規格は暫定規格とした。今後必要な情報を得るためにさらなる工夫が必要であると共に、流通実態の有無についても見極め、規格作成の優先順位を明確にする必要がある。

平成27年度では、第10版食品添加物公定書収載を目指して更に検証用の規格を作成し試料の収集を進めると共に、既存添加物の自主規格の整備と改良に関する検討を継続する。

本年度の調査研究に際しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の穂山先生をはじめとする諸先生方には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし心より感謝申しあげる次第である。

以上

別 紙

調査研究者名簿

	氏 名	企 業 名
技術委員長	森將人	日本食品添加物協会
自主規格専門委員長、部会長・部会担当	西宮隆	株式会社タイショーテクノス
規格専門委員長	斎藤知明	MCフーズスペシャリティーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本正次	丸善製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島光一	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	大本俊郎	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	橋本成久	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	松岡賢一	DSP五協フード&ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	増田哲也	エーザイフード・ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	尾崎史浩	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小川知成	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間保憲	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	香村正徳	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	廣田佳卓	花王株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	関谷史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	稲井隆之	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	阿部貴宏	三菱化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島敏貴	上野製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山田益己	理研ビタミン株式会社
技 術 顧 問	山田隆	一般社団法人日本食品添加物協会
技 術 顧 問	高橋仁一	一般社団法人日本食品添加物協会

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物生コーヒー豆抽出物の成分研究

要旨 既存添加物名簿収載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物は、「アカネ科コーヒー（*Coffea arabica* LINNE）の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。本研究では、生コーヒー豆抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、製品中の含有成分について検討を行った。その結果、10種の化合物〔5-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)、4-*O*-caffeoylquinic acid、5-*O*-feruloylquinic acid、4-*O*-feruloylquinic acid、3-*O*-feruloylquinic acid、caffeine、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid、3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid、*trans-p*-coumaroyl-L-tryptophan〕が同定された。現在、DPPH ラジカル活性を指標に酸化防止能を検討するとともに、その他の成分について、網羅的に解析を進めている。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 講師
杉脇 秀美 松山大学薬学部 嘱託職員

A. 研究目的

コーヒーは、茶などとともに世界中で飲用されている重要な嗜好品の一つである。コーヒー豆の栽培種は *Coffea arabica* が主で、成分としてはカフェイン、クロロゲン酸等が知られている。一方で、コーヒー豆は食品添加物としても利用されており、生コーヒー豆抽出物として、酸化防止剤、製造用剤を用途に既存添加物名簿に収載されている。既存添加物名簿に生コーヒー豆抽出物は、「アカネ科コーヒー（*Coffea arabica* LINNE）の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。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が、本添加物については未検討であるため、その精査が求められる。そこで本研究では、生コーヒー豆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て検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

試料となる生コーヒー豆抽出物は日本食品添加物協会を通じて入手した。分離、精製にはカラム充填剤として YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシィ)、Chromatorex ODS (富士シリシア)を用いた。Caffeine、chlorogenic acid、5-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid、3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid はシグマ製を用いた。

その他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使用した。

2. 装置および測定条件

逆相 HPLC は、Shimadzu Prominence システム（島津製作所）を使用した。測定条件は下記のとおり。カラム：L-column ODS (2.1 I.D. × 150 mm)（化学物質評価研究機構）、カラム温度：40°C、流速：0.3 mL/min、測定波長：200–400 nm、移動相：(A) 5%酢酸および (B) アセトニトリル〔濃度勾配条件 (B in A) : 0→30 min (0→50%)、30→35 min (50→85%)、35→40 min (85%)、40→50 min (85→90%)、50→55 min (90→100%)、55→60 min (100%)〕。

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、測定溶媒としてメタノール-*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〔メタノール-*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、測定溶媒にはアセトニトリルを用いた。

3. 化合物の単離

生コーヒー豆抽出物 (150 g) を減圧濃縮後、凍結乾燥し、濃縮物 (64.1 g) を得た。濃縮物 (1回目: 1.0 g、2回目: 10 g) を YMC gel ODS-AQ、Sephadex LH-20、Chromatorex ODS による分離・精製を繰り返し、化合物の単離を行った。単離した既知化合物については HPLC での標品との直接比較、あるいは文献値と NMR データ等の比較によって同定した。

4. 生コーヒー豆抽出物の HPLC 分析

生コーヒー豆抽出物製品について、上記条件で HPLC 分析を行った。また、単離した各化合物についても同条件で分析を行い、抽出物製品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

生コーヒー豆抽出物の濃縮物について、カラ

ムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し 5-*O*-caffeoylquinic acid (1) (3.2 mg)、3-*O*-caffeoylquinic acid (2) (78.1 mg)、5-*O*-feruloylquinic acid (4) (12.6 mg)、caffeine (5) (327.1 mg)、4-*O*-feruloylquinic acid (6) (23.6 mg)、3-*O*-feruloylquinic acid (7) (140.6 mg)、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (8) (48.5 mg)、*trans-p*-coumaroyl-L-tryptophan (10) (5.8 mg) を単離、同定し、標品とした。4-*O*-Caffeoylquinic acid (3)、3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid (9) は、市販品を標品として用いた。単離、同定した化合物の NMR データを以下に記す。

5-*O*-Caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid) (1):

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 7.58 (1H, d, *J*=16, H-7'), 7.05 (1H, d, *J*=2, H-2'), 6.93 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6'), 6.75 (1H, d, *J*=8, H-5'), 6.29 (1H, d, *J*=16, H-8'), 5.30 (1H, m, H-5), 4.12 (1H, m, H-3), 3.60 (1H, m, H-4), 1.89-2.20 (4H, m, H-2, 6).

3-*O*-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid) (2):

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 7.55 (1H, d, *J*=16, H-7'), 7.04 (1H, d, *J*=2, H-2'), 6.95 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6'), 6.77 (1H, d, *J*=8, H-5'), 6.25 (1H, d, *J*=16, H-8'), 5.33 (1H, m, H-3), 4.26 (1H, m, H-5), 3.71 (1H, dd, *J*=3, 8.5, H-4), 1.98-2.20 (4H, m, H-2, 6).

5-*O*-Feruloylquinic acid (4): ¹H-NMR (CD₃OD) δ:

7.64 (1H, d, *J*=16, H-7'), 7.18 (1H, d, *J*=2, H-2'), 7.06 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6'), 6.80 (1H, d, *J*=8, H-5'), 6.39 (1H, d, *J*=16, H-8'), 5.40 (1H, m, H-5), 3.98 (1H, m, H-3), 3.88 (3H, s, -OMe), 3.80 (1H, m, H-4), 1.89-2.20 (4H, m, H-2, 6).

Caffeine (5): ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 7.49 (1H, s, H-8), 3.97 (3H, s, N7-CH₃), 3.56 (3H, s, N3-CH₃), 3.38 (3H, s, N1-CH₃).

4-*O*-Feruloylquinic acid (6): ¹H-NMR (CD₃OD) δ:

7.68 (1H, d, *J*=16, H-7'), 7.20 (1H, d, *J*=2, H-2'), 7.09 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6'), 6.80 (1H, d, *J*=8, H-5'), 6.43 (1H, d, *J*=16, H-8'), 4.90 (1H, m, H-4), 4.28 (1H, m, H-5), 4.13 (1H, m, H-3), 3.89 (3H, s, -OMe), 1.95-2.11 (4H, m, H-2, 6).

3-*O*-Feruloylquinic acid (7): ¹H-NMR (CD₃OD) δ:

7.61 (1H, d, *J*=16, H-7'), 7.17 (1H, d, *J*=2, H-2'), 7.07 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6'), 6.80 (1H, d, *J*=8,

H-5'), 6.33 (1H, d, $J=16$, H-8'), 5.34 (1H, m, H-3), 4.17 (1H, m, H-5), 3.72 (1H, m, H-4), 3.88 (3H, s, -OMe), 2.04-2.24 (4H, m, H-2, 6).

4,5-Di-*O*-caffeoylquinic acid (8): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 7.57 (1H, d, $J=16$), 7.52 (1H, d, $J=16$) (H-7', 7''), 7.03, 7.01 (each 1H, d, $J=2$, H-2', 2''), 6.91, 6.85 (each 1H, dd, $J=2$, 8, H-6', 6''), 6.76, 6.72 (each 1H, d, $J=8$, H-5', 5''), 6.27, 6.23 (each 1H, d, $J=16$, H-8', 8''), 5.63 (1H, m, H-5), 5.00 (1H, m, H-4), 4.37 (1H, m, H-3), 2.05-2.37 (4H, m, H-2, 6).

trans-p-Coumaroyl-L-tryptophan (10): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 7.58 (1H, d, $J=8$, H-4), 7.40 (1H, $J=16$, H-7'), 7.37 (2H, $J=16$, H-2', 6'), 7.30 (1H, $J=8$, H-7), 7.09 (1H, s, H-2), 7.06 (1H, brt, $J=8$), 6.77 (2H, $J=8$, H-3', 5'), 6.42 (1H, d, $J=16$, H-7'), 4.90 (1H, m, H-11), 3.40 (1H, $J=5$, 15, H-10), 3.23 (1H, $J=7.5$, 15) (each H-11). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 124.3 (C-2), 111.2 (C-3), 118.2 (C-4), 122.4 (C-5), 119.8 (C-6), 112.2 (C-7), 138.0 (C-8), 129.0 (C-9), 55.1 (C-8'), 28.7 (C-7'), 175.6 (C-9'), 127.7 (C-1'), 130.7 (2C, C-2', 6'), 116.7 (2C, C-3', 5'), 160.6 (C-4'), 118.2 (C-10), 142.3 (C-11), 170.0 (C-12).

2. 添加物製品の分析

生コーヒー豆抽出物製品の HPLC 分析を行った結果、図 1 に示すチャートが得られた。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検出成分は *caffeine* やカフェー酸及びフェルラ酸誘導体であった。

D. 考察

既存添加物名簿に生コーヒー抽出物の有効成分は、「クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。今回の成分精査の結果、認められた成分の大半がクロロゲン酸等のカフェー酸及びフェルラ酸誘導体であり、これらが添加物としての活性に寄与していることが示唆された。今後、成分と酸化防止能の関係を検討するとともに、その他の成分について、網羅的に解析を進めている予定である。

E. 結論

酸化防止剤として既存添加物名簿に収載されている「生コーヒー豆抽出物」の品質規格作成に供する化学的検討として、本抽出物製品中の含有成分について精査した結果、10 種の化合物〔5-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)、4-*O*-caffeoylquinic acid、5-*O*-feruloylquinic acid、4-*O*-feruloylquinic acid、3-*O*-feruloylquinic acid、*caffeine*、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid、3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid、*trans-p*-coumaroyl-L-tryptophan〕が同定された。主検出成分は *caffeine*、カフェー酸及びフェルラ酸誘導体であった。

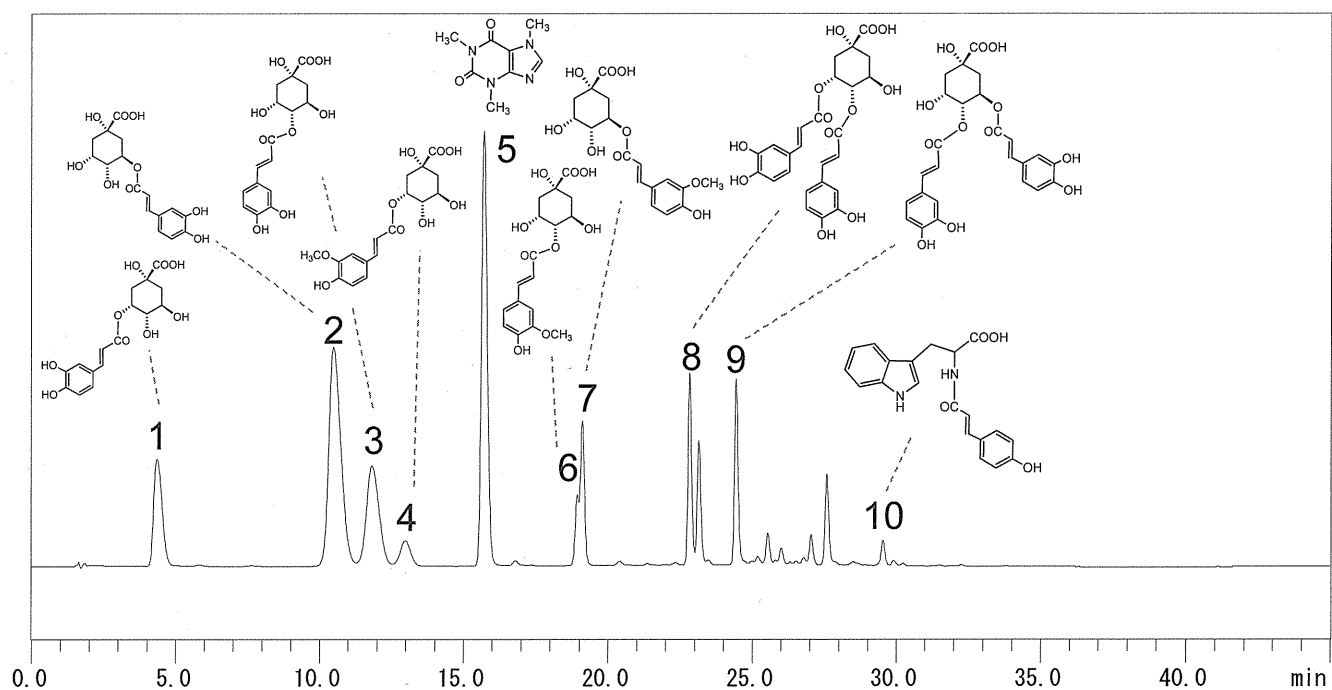
F. 研究発表

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
なし

H. 健康危機情報
なし



- | | |
|--|--|
| 1. 5-O-Caffeoylquinic acid | 6. 4-O-Feruloylquinic acid |
| 2. 3-O-Caffeoylquinic acid
(Chlorogenic acid) | 7. 3-O-Feruloylquinic acid |
| 3. 4-O-Caffeoylquinic acid | 8. 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid |
| 4. 5-O-Feruloylquinic acid | 9. 3,4-Di-O-caffeoylquinic acid |
| 5. Caffeine | 10. <i>trans-p</i> -Coumaroyl-tryptophan |

図1 生コーヒー豆抽出物の HPLC クロマトグラム

検出：280 nm

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物ゲンチアナ抽出物の品質評価法の検討

要旨 既存添加物名簿収載のゲンチアナ抽出物は「リンドウ科ゲンチアナの根又は根茎より、水又はエタノールで抽出して得られたもの」であり、「その有効成分はゲンチオピクロシド及びアマロゲンチンである」とされる。これまで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の検討し、17種の化合物を単離、構造決定し、gentiopicroside等を主成分として報告している。本研究では、本添加物の確認試験を提案する目的で、HPLC及びTLCによる定性試験、HPLCによる定量分析について検討した。その結果、gentiopicroside及びamarogentinを指標成分として確認、定量する方法を作成した。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 講師
杉脇 秀美 松山大学薬学部 嘱託職員

て精査し、主要成分を含め 17 種の化合物を明らかにしている。本研究では、これまでの結果を踏まえた確認試験法の設定を目的に検討を行った。

A. 研究目的

既存添加物名簿収載のゲンチアナ抽出物は「リンドウ科ゲンチアナの根又は根茎より、水又はエタノールで抽出して得られたもの」とされ、苦味料等として用いられる。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、定義化されている一方で、成分規格は設定されていないものが多い。ゲンチアナ抽出物も規格化されていぬ添加物の一つで、その品質管理のための規格作成を目的に、これまで本添加物の含有成分につい

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

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。リュウタン（生薬）はウチダ和漢薬製を用いた。Gentiopicroside 及び amarogentin は和光純薬製を用いた。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。

2. 装置及び測定条件

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、TLC Silica gel 60F₂₅₄ plate (Merck 社製) を用いた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。

分析条件は以下のとおり。カラム：L-column ODS (2.1 I.D. × 150 mm) (化学物質評価研究機構)、カラム温度：40℃、流速：0.3 mL/min、測定波長：254 nm、移動相：(A) 5%酢酸/アセトニトリル (95:4)、(B) 5%酢酸/アセトニトリル (82:18)。

3. 試料調製

3-1. HPLC による方法

試料約 0.5 g をメタノール 100 mL に溶解し、検液とした。gentiopicroside 及び amarogentin のそれぞれ約 1 mg をメタノール 10 mL に溶かし、標準液とした。検液及び標準液につき、HPLC 分析を行った。

3-2. TLC による方法

試料約 0.1 g をメタノール 10 mL に溶解し、検液とした。gentiopicroside 及び amarogentin のそれぞれ約 1 mg をメタノール 10 mL に溶かし、標準液とした。検液及び標準液につき、TLC に供した。

C. 研究結果

1. HPLC による確認試験

Gentiopicroside 及び amarogentin 標準液のピークが約 10 分となる条件を検討した。その結果、5%酢酸/アセトニトリル (95:5)、(82:18) を移動相とし、下記に示す操作条件で、それぞれのピークを確認できた。本条件で、試料について分析したところ、それぞれの標準品と一致するピークを確認した (図 1)。

[操作条件]

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長 254 nm)、カラム充てん剤：5 mm の液体クロマトグラフ

イー用オクタデシルシリル化シリカゲル、カラム管：内径 2.0 mm、長さ 15 cm のステンレス管、カラム温度：40℃、移動相：5%酢酸/アセトニトリル混液 (95:5) (条件 1：gentiopicroside)、5%酢酸/アセトニトリル混液 (82:18) (条件 2：amarogentin)、流量：0.3 mL/min (流量は、gentiopicroside または amarogentin の保持時間が約 10 分付近になるよう調整する)

2. TLC による確認試験

TLC 法については、第 16 改正日本薬局方収載「ゲンチアナ」の確認試験を準用した。すなわち、試料及び標準溶液を TLC 板にスポットし、酢酸エチル/エタノール/水混液 (8:2:1) を展開溶媒として展開した後、紫外線 (主波長 254 nm) を照射した。その結果、 R_f 約 0.6 付近に gentiopicroside, R_f 約 0.8 付近に amarogentin のスポットを検出し、試料溶液について検討した結果、gentiopicroside のスポットを明瞭に確認することができた (図 2)。

一方で、ゲンチアナと同じリンドウ科の同属植物を基原とし、日本薬局方において gentiopicroside を主要成分とする同様の確認試験が設定されている生薬としてリュウタン (竜胆) がある。そこで、リュウタンとゲンチアナ抽出物の TLC による比較を行った。その結果、gentiopicroside 以外にそれぞれの特有スポットが観察された (図 3)。

3. 定量法

HPLC による方法を検討した。分析条件は、HPLC による確認試験の条件を準用した。検体の調製は、試料を乾燥しその約 1.0 g を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100 mL とし、別に gentiopicroside 及び

amarogentin を乾燥し、その約 0.01 g を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100 mL としたものを標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液をそれぞれ 2 μ L ずつ量り、それぞれのピーク面積比に基づき、下記より含量を求めた。

[含量 (%)]

検液のピーク面積 A_{ta} 又は A_{tb} 、標準液の gentiopicroside のピーク面積 A_{sa} 又は amarogentin のピーク面積 A_{sb} :

Gentiopicroside の含量 (%)

$$= \text{Gentiopicroside の採取量 (g) / 試料の採取量 (g)} \times A_{ta}/A_{sa} \times 100$$

Amarogentin の含量 (%)

$$= \text{Amarogentin の採取量 (g) / 試料の採取量 (g)} \times A_{tb}/A_{sb} \times 100$$

D. 考察

ゲンチアナの苦味成分として、amarogentin、gentiopicroside 等が知られているが、本添加物試料から amarogentin は単離されず、HPLC 分析でごく少量の検出が観察されたのみであった。Amarogentin は原料の栽培年数の経過により、含量が減少する報告があり、5 年以上栽培したものでほぼ一定 (0.2~0.4 mg/g) になるとされるが、市場品の含有量については大きな差が認められた報告がある¹⁾。一方、本試料で主検出された gentiopicroside は市場品で約 30~40 mg/g と amarogentin と比較すると約 100 倍量含み、ばらつきが少ないと報告されている¹⁾。よって、今回の試料のように、これら 2 化合物がいずれも再現よく検出されないことも想定される。2 化合物を主要成分として追求するのであれば、“gentiopicroside 又は amarogentin のいずれかを検出する” とし、あるいは原料 (基原)

を確認するのであれば、局方のゲンチアナ試験を準用して、“gentiopicroside のみの検出” で適用可能と考えられる。

E. 結論

ゲンチアナ抽出物の確認試験、定量試験について検討した結果、試験法を下記のように作成した。

[確認試験]

(1) 液体クロマトグラフィーによる方法

本品約 0.5 g をメタノール 100 mL に溶解し、検液とする。ゲンチオピクロシド及びアマロゲンチンのそれぞれ約 1 mg をメタノール 10 mL に溶かし、標準液とする。検液及び標準液につき、定量法の条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、検液の主ピークの保持時間は、標準液のゲンチオピクロシド及びアマロゲンチンの両方あるいは一方のピークの保持時間と一致する。

(2) 薄層クロマトグラフィーによる方法

本品約 0.1 g をメタノール 10 mL に溶解し、検液とする。ゲンチオピクロシド及びアマロゲンチンのそれぞれ約 1 mg をメタノール 10 mL に溶かし、標準液とする。検液及び標準液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。検液及び標準液 5 μ L ずつ薄層クロマトグラフィー用シリカゲル (蛍光剤入り) を用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/エタノール/水混液 (8:2:1) を展開溶媒として展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射するとき、試料溶液から得たスポットは標準液から得たスポットと色調及び R_f 値が等しい。

[定量試験]

本品を乾燥し、その約 1.0 g を精密に量り、

メタノールに溶かして正確に 100 mL とし、検液とする。別にゲンチオピクロシド及びアマロゲンチンを乾燥し、その約 0.01 g を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100 mL とし、標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ 2 μ L ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。検液のピーク面積 A_{ta} 又は A_{tb} 、標準液のゲンチオピクロシドのピーク面積 A_{sa} 又はアマロゲンチンのピーク面積 A_{sb} を測定し、次式により含量を求める。

ゲンチオピクロシドの含量 (%)

$$= \text{ゲンチオピクロシドの採取量 (g)} / \text{試料の採取量 (g)} \times A_{ta}/A_{sa} \times 100$$

アマロゲンチンの含量 (%)

$$= \text{アマロゲンチンの採取量 (g)} / \text{試料の採取量 (g)} \times A_{tb}/A_{sb} \times 100$$

【操作条件】

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 254 nm）

カラム充てん剤：5 mm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.0 mm，長さ 15 cm のステンレス管

カラム温度：40℃

移動相：5%酢酸/アセトニトリル混液（95:5）（ゲンチオピクロシド）、5%酢酸/アセトニトリル混液（82:18）（アマロゲンチン）

流量：0.3 mL/min

（流量は、アマロゲンチンまたはゲンチオピクロシドの保持時間が約 10 分付近になるよう調整する）

【参考文献】

- 1) 林 隆章、南山 豊、三浦豊雄、山岸 喬、金島弘恭：ゲンチアナの栽培条件および化学的品質評価、*道衛研所報* **40**、103-106（1990）。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 天倉吉章，好村守生，森本沙羅，吉田隆志，多田敦子，伊藤裕才，杉本直樹，山崎壮，穠山浩，既存添加物ゲンチアナ抽出物の成分研究，日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会，2014 年 5 月（東京）

G. 知的財産権の出願，登録状況

なし

H. 健康危機情報

なし

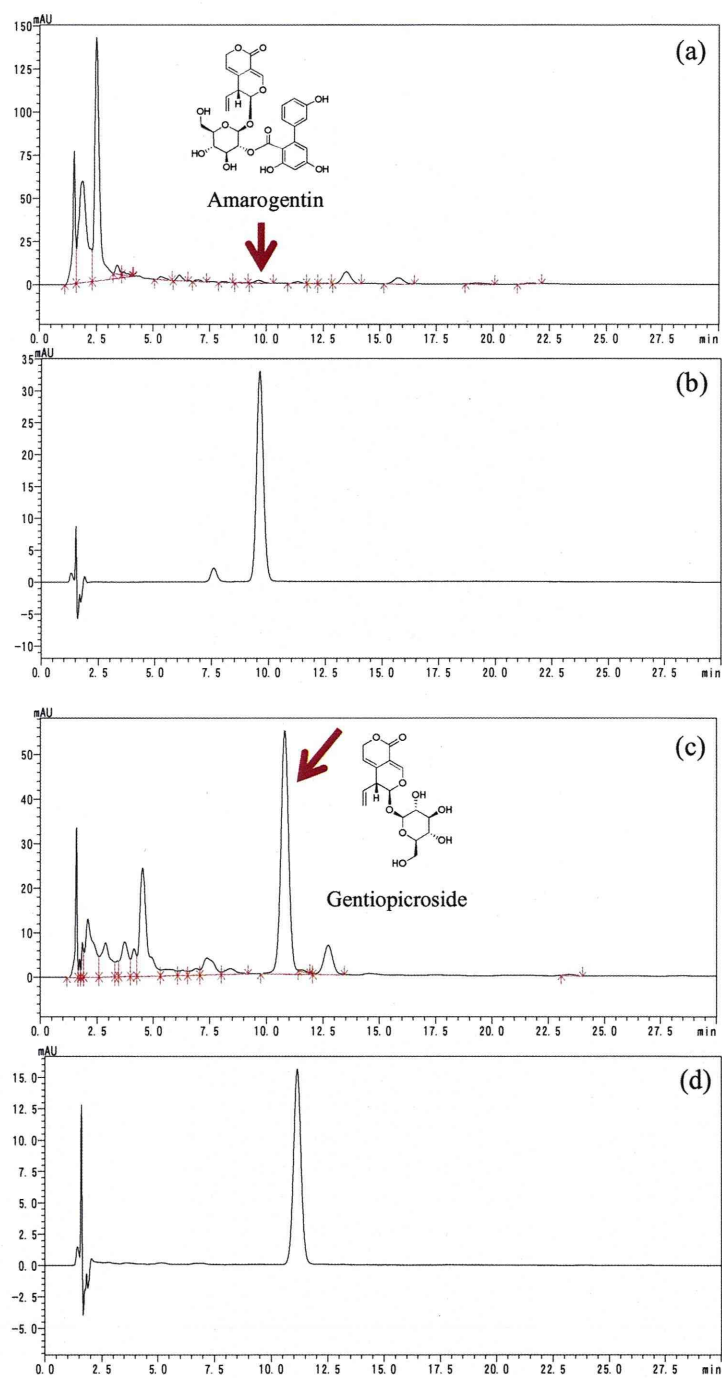


図1 ゲンチアナ抽出物の HPLC クロマトグラム
 (a) ゲンチアナ抽出物、(b) amarogentin [条件 1]、
 (c) ゲンチアナ抽出物、(d) gentiopicroside [条件 2]

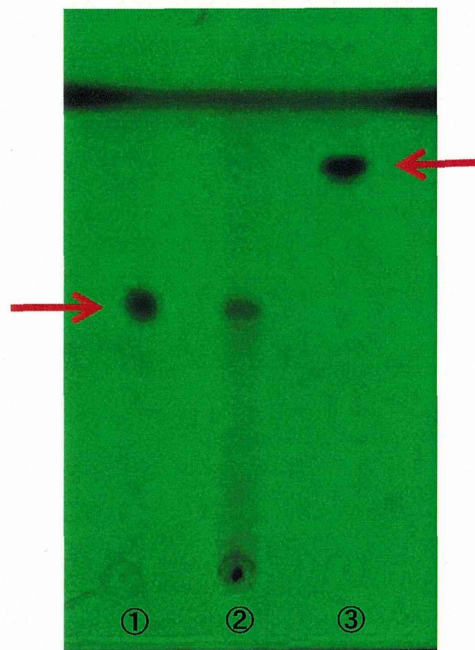


図2 ゲンチアナ抽出物の TLC

① gentiopicroside、② ゲンチアナ抽出物、③ amarogentin

検出：UV 照射 (254 nm)

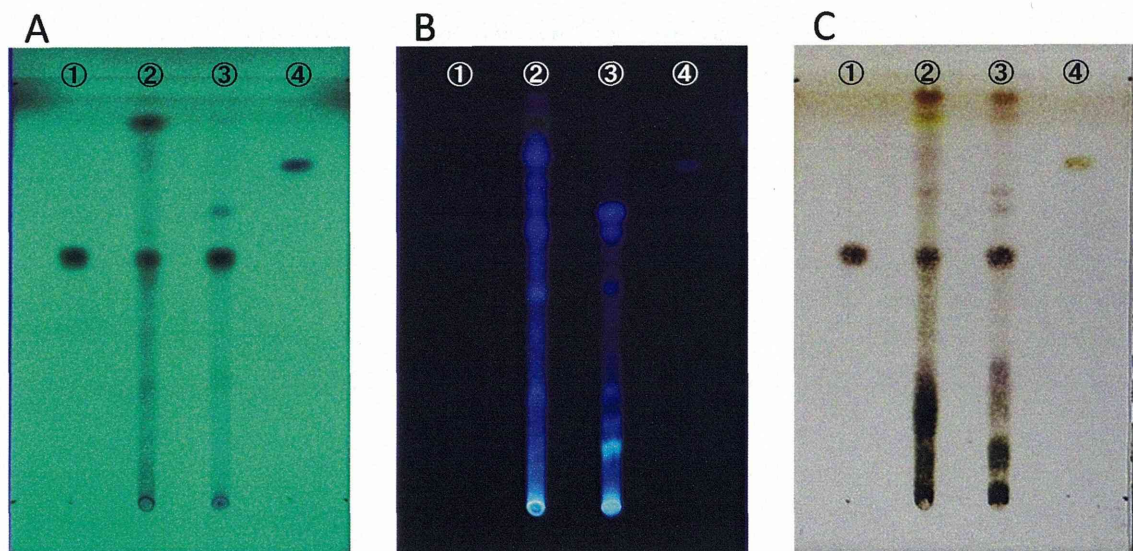


図3 ゲンチアナ抽出物とリュウタンの比較 (TLC)

① gentiopicroside、② ゲンチアナ抽出物、③ リュウタン、④ amarogentin

検出：A (紫外線照射 254 nm)、B (紫外線照射 366 nm)、C (希硫酸試験噴霧後加熱)

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物モウソウチク抽出物の成分研究

要旨 既存添加物名簿収載のモウソウチク抽出物は「イネ科モウソウチク (*Phyllostachys heterocyclus* MITF.) の茎の表皮を、粉碎したものより、微温時エタノールで抽出して得られたもの」であり、2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを主成分とするものとされる。本研究では、モウソウチク抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、本製品中の含有成分について検討を行った。その結果、現在までに11種の既知化合物 [5-hydroxymethyl-2-furfural、4-hydroxybenzoic acid、*p*-coumaric acid、*trans*-ferulic acid、*N,N'*-diferuloylputrescine、arbutin、tachioside、isotachioside、4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside、aburaside、yoniresinol 9'-*O*-glucoside] とともに、PH-1と仮称する1種の新規化合物を単離し、その構造を明らかにした。さらに、単離した化合物を標準品としてHPLC分析を行った結果、本製品中には*p*-coumaric acid、3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside、yoniresinol 9'-*O*-glucosideが主要成分として含まれることが明らかとなった。また、本製品中の主要成分として知られている2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinoneは、今回の分析結果ではマイナー成分として観察されるのみであった。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 講師

基礎的な化学データの集積を目的として検討を行った。

A. 研究目的

既存添加物名簿収載のモウソウチク抽出物は「モウソウチクの茎の表皮から得られた、2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを主成分とするもの」とされ、製造用剤として用いられる。また、その基原・製法・本質は、「イネ科モウソウチク (*Phyllostachys heterocyclus* MITF.) の茎の表皮を、粉碎したものより、微温時エタノールで抽出して得られたもの」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、モウソウチク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

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

試料となるモウソウチク抽出物は日本食品添加物協会を通じて入手した。分離、精製にはカラム充填剤として Diaion HP-20（三菱化学）、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）を用いた。その他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使用した。また、2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinoneの標準品は和光純薬工業社製 (046-27081) を用いた。

2. 装置および測定条件

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: 280 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%)]。また、糖の確認反応においては、以下の条件で分析を行った。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: 0.2 mL/min、測定波長: 254 nm、試料注入量: 3 µL、移動相: アセトニトリル: 50 mM リン酸 (25: 75)。

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、測定溶媒としてアセトン-*d*₆、メタノール-*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 [アセトン-*d*₆ (¹H: 2.04 ppm, ¹³C: 29.8 ppm)、メタノール-*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またはアセトニトリルを用いた。

3. 化合物の単離

モウソウチク抽出物に蒸留水を加えて溶解させ、それに *n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールを順次加えて分配を行い、各分画物を得た。そのうち酢酸エチル分画物及び *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 [Diaion HP-20、YMC gel ODS-AQ、Sephadex LH-20、Chromatorex ODS] による分離・精製を繰り返し、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。単離した既知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 NMR データ等の比較によって同定した。新規化合物 (仮称 PH-1) については 2 次元 NMR を含む詳細なスペクトル解析及びマススペクトルのデータから構造決定を行った。

4. モウソウチク抽出物の HPLC 分析

モウソウチク抽出物製品をメタノールに溶解させ、上記条件で HPLC 分析を行った。また、単離した各化合物についても同条件で分析を行い、抽出物製品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

モウソウチク抽出物 (23.4 g) に水 (700 mL) を加えて溶解させ、*n*-ヘキサン (2.1 L)、酢酸エチル (2.1 L)、*n*-ブタノール (2.1 L) で順次抽出を行い、各分画物 [*n*-ヘキサン分画物 (52.8 mg)、酢酸エチル分画物 (683.8 mg)、*n*-ブタノール抽出物 (3.8 g)、水分画物 (20.9 g)] を得た。そのうち酢酸エチル分画物 (586.3 mg/683.8 mg) 及び *n*-ブタノール分画物 (2.5 g/3.8 g) について各種カラムクロマトグラフィー [Diaion HP-20、YMC gel ODS-AQ、Sephadex LH-20、Chromatorex] による分離、精製を繰り返し、酢酸エチル分画物から 5-hydroxymethyl-2-furfural (1) (1.5 mg)、4-hydroxybenzoic acid (2) (2.4 mg)、*p*-coumaric acid (3) (5.4 mg)、*trans*-ferulic acid (4) (1.5 mg)、*N,N'*-diferuloylputrescine (5) ¹⁾ (1.3 mg) を、*n*-ブタノール分画物から β-arbutin (6) (4.8 mg)、tachioside (7) ²⁾ (8.4 mg)、isotachioside (8) ²⁾ (4.9 mg)、3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside (9) ³⁾ (9.6 mg)、koaburaside (10) ⁴⁾ (0.8 mg)、lyoniresinol 9'-*O*-glucoside (11) ⁵⁾ (60.8 mg)、PH-1 (12) (1.1 mg) を単離した。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及び逆相 HPLC での標品との直接比較によって行った。また、本検討で得られた PH-1 (12) 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: 5-hydroxymethyl-2-furfural

2: 4-hydroxybenzoic acid

3: *p*-coumaric acid

4: *trans*-ferulic acid

5: *N,N'*-diferuloylputrescine

6: β-arbutin

7: tachioside

8: isotachioside

9: 3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside

10: koaburaside

11: lyoniresinol 9'-*O*-glucoside

12: PH-1

各化合物の構造式を図2に示す。また、以下に各化合物の機器分析データを記す。

5-Hydroxymethyl-2-furfural (1): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- 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).

4-Hydroxybenzoic acid (2): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 7.86 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2, 6), 6.80 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3, 5).

p-Coumaric acid (3): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.44 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2, 6), 6.80 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3, 5), 6.27 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8). $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 171.0 (C-9), 161.2 (C-4), 146.6 (C-7), 131.1 (2C, C-2, 6), 127.3 (C-1), 116.8 (2C, C-3, 5), 115.7 (C-8).

trans-Ferulic acid (4): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 7.58 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.05 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6), 6.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 3.89 (3H, s, 3-OMe).

N,N'-Diferuloylputrescine (5): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 7.43 (2H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7, 7'), 7.11 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2, 2'), 7.02 (2H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-5, 5'), 6.42 (2H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8, 8'), 3.87 (6H, s, 3-OMe), 3.32 (overlapped, H-10, 10'), 1.64 (4H, m, H-11, 11'). HR-ESI-MS: m/z 439.1871 ([M-H]⁺, Calcd for C₂₄H₂₇N₂O₆: 439.1875).

β -Arbutin (6): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 6.96 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2, 6), 6.68 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3, 5), 4.72 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc H-1), 3.87 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.69 (1H, dd, $J = 4.5, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.35–3.42 (4H, m, Glc H-2–5). $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 153.8 (C-4), 152.5 (C-1), 119.4 (2C, C-2, 6), 116.6 (2C, C-3, 5), 103.7 (Glc C-1), 78.07, 78.03 (each 1C, Glc C-3, 5), 75.0 (Glc C-2), 71.5 (Glc C-4), 62.6 (Glc C-6).

HR-ESI-MS: m/z 271.0796 ([M-H]⁺, Calcd for C₁₂H₁₄O₇: 271.0823).

Tachioside (7): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 6.79 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-2), 6.68 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5), 6.57 (1H, dd, $J = 2.5, 9.0$ Hz, H-6), 4.73 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc H-1), 3.89 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.82 (3H, s, 3-OMe), 3.67 (1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.34–3.43 (4H, m, Glc H-2–5). $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 152.8 (C-1), 149.3 (C-3), 143.0 (C-4), 116.0 (C-5), 110.0 (C-6), 103.81, 103.84 (each 1C, C-2, Glc C-1), 78.1, 78.2 (each 1C, Glc C-3, 5), 75.0 (Glc C-2), 71.6 (Glc C-4), 62.7 (Glc C-6), 56.4 (3-OMe).

Isotachioside (8): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 7.01 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6), 6.46 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-3), 6.29 (1H, dd, $J = 3.0, 9.0$ Hz, H-5), 4.69 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc H-1), 3.85 (1H, dd, $J = 2.5, 12.5$ Hz, Glc H-6), 3.80 (3H, s, 2-OMe), 3.67 (1H, dd, $J = 5.5, 12.5$ Hz, Glc H-6), 3.31–3.43 (4H, m, Glc H-2–5).

3,4'-Dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside (9): $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 7.90 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2, 6), 6.84 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3, 5), 4.30 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc H-1), 4.24 (1H, dt, $J = 6.5, 6.5, 10.0$ Hz, H-9), 3.98 (1H, dt, $J = 6.5, 6.5, 10.0$ Hz, H-9), 3.82 (1H, dd, $J = 1.5, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.64 (1H, dd, $J = 5.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.25–3.32 (overlapped, Glc H-3–5, H-8), 3.14 (1H, dd, $J = 7.5, 9.0$ Hz, Glc H-2). $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4) δ : 199.4 (C-7), 163.9 (C-4), 132.0 (2C, C-2, 6), 130.2 (C-1), 116.3 (2C, C-3, 5), 104.7 (Glc C-1), 77.96, 78.03 (each 1C, Glc C-3, 5), 75.1 (Glc C-2), 71.6 (Glc C-4), 66.5 (C-9), 62.7 (Glc C-6), 39.4 (C-8).

Koaburaside (10): $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 7.83 (1H, br s, 4-OH), 6.38 (2H, s, H-2, 6), 5.20 (1H, br d, Glc 2-OH), 5.04 (1H, br s, Glc 3-OH), 4.98 (1H, br d, Glc 4-OH), 4.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc H-1), 4.60 (1H, br t, Glc 6-OH), 3.71 (7H, m, Glc H-6, 3-OMe, 5-OMe), 3.42 (1H, m, Glc H-6), 3.28 (overlapped, Glc H-5), 3.25 (1H, br d, Glc H-3), 3.20 (1H, br d, Glc H-2), 3.10 (1H, br d, Glc H-4).

Lyoniresinol 9'-*O*-glucoside (11): $^1\text{H-NMR}$

(methanol- d_4) δ : 6.56 (1H, s, H-6), 6.42 (2H, s, H-2', 6'), 4.41 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-7'), 4.28 (1H, d, J = 8.0 Hz, Glc H-1), 3.88 (1H, dd, J = 5.5, 9.5 Hz, H-9'), 3.84 (3H, s, 5-OMe), 3.83 (1H, dd, J = 2.0, 11.5 Hz, Glc H-6), 3.73 (6H, s, 3', 5'-OMe), 3.63-3.37 (2H, m, H-9, Glc H-6), 3.54 (1H, dd, J = 6.5, 10.5 Hz, H-9), 3.45 (1H, dd, J = 4.5, 9.5 Hz, H-9'), 3.37 (1H, t, J = 9.0 Hz, Glc H-3), 3.30 (overlapped, 3-OMe, Glc H-4), 3.22-3.27 (2H, m, Glc H-2, 5), 2.70 (1H, dd, J = 4.5, 15.0 Hz, H-7), 2.60 (1H, dd, J = 11.5, 15.0 Hz, H-7), 2.08 (1H, m, H-8'), 1.71 (1H, m, H-8). ^{13}C -NMR (methanol- d_4) δ : 148.9 (2C, C-3', 5'), 148.6 (C-5), 147.5 (C-3), 139.3 (C-1'), 138.9 (C-4), 134.4 (C-4'), 130.2 (C-1), 126.4 (C-2), 107.8 (C-6), 106.9 (2C, C-2', 6'), 104.8 (Glc C-1), 78.2 (Glc C-3), 77.9 (Glc C-5), 75.1 (Glc C-2), 71.6 (Glc C-4), 71.5 (C-9'), 66.2 (C-9), 62.8 (Glc C-6), 60.2 (3-OMe), 56.9 (2C, 3', 5'-OMe), 56.6 (5-OMe), 46.7 (C-8'), 42.8 (C-7'), 40.6 (C-8), 33.8 (C-7). HR-ESI-MS: m/z 581.2218 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_{13}$: 581.2240), 605.2233 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{13}+\text{Na}$: 605.2205).

PH-1 (12): ^1H -NMR (methanol- d_4) δ : 7.98 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, 6), 7.19 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3, 5), 4.99 (1H, d, J = 7.5 Hz, Glc H-1), 4.31 (1H, d, J = 7.5 Hz, Xyl H-1), 4.11 (1H, dd, J = 2.0, 12.0 Hz, Glc H-6), 3.82 (1H, m, Xyl H-5), 3.75 (1H, m, Glc H-6), 3.19-3.48 (7H, m, Glc H-2-5, Xyl H-2-4), 3.08 (1H, dd, J = 10.0, 11.0 Hz, Xyl H-5), 3.02 (2H, dq, J = 1.5, 7.5, 7.5, 7.5 Hz, H-8), 1.17 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-9). ^{13}C -NMR (methanol- d_4) δ : 202.1 (C-7), 163.0 (C-4), 132.5 (C-1), 131.4 (C-2, 6), 117.4 (C-3, 5), 105.4 (Xyl C-1), 101.5 (Glc C-1), 77.6, 77.7, 77.8 (each 1C, Glc C-3, 5, Xyl C-3), 74.8, 75.0 (each 1C, Glc C-2, Xyl C-2), 71.2, 71.4 (each 1C, Glc C-4, Xyl C-4), 69.8 (Glc C-6), 66.9 (Xyl C-5), 32.4 (C-8), 8.8 (C-9). HR-ESI-MS: m/z 581.2218 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_{13}$: 581.2240), 605.2233 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{13}+\text{Na}$: 605.2205).

2. PH-1 (12) の構造解析

PH-1 は淡褐色無晶系粉末として得られ、高分解能 ESI-MS の測定結果 (m/z 467.1553 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) から分子量は $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ であることが示された。

^1H -NMR スペクトル (図 3) では、芳香族プロトン領域にメタカップリングした 2H-doublet が 2 本、脂肪族プロトン領域に糖 2 つ分のシグナルに加えてエチルケトン由来のシグナルが観察されたことから、*propiophenone* の *p*-位に糖が結合していると推察された。また、 ^{13}C -NMR スペクトル (図 4) において *propiophenone* 由来のシグナルの他に糖由来のシグナルが 11 本観察され、そのケミカルシフトから糖部分はグルコースとキシロースで構成されると推定された。

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 5 に示す相関が観察されたことから *propiophenone* 骨格の存在が裏付けられるとともに、4 位の水酸基にグルコースが、またグルコースの 6 位にキシロースが結合している構造であることが明らかになった。

構成糖の確認⁶⁾については、本化合物 (0.1 mg) に 1M HCl (100 μL) を加え、105°C で 1 時間反応を行った。反応液をイオン交換樹脂 (Amberlite IRA-400) で中和後、濃縮乾固させた。得られた酸加水分解物に L-cysteine methyl ester hydrochloride (5 mg/mL, pyridine 溶液) 50 μL を加え、60°C で 1 時間反応させた後、*o*-tolyl isothiocyanate (5 mg/mL, pyridine 溶液) 50 μL を加え、1 時間反応を行った。同様の条件で反応をさせた D-、L-グルコース、D-、L-キシロース標準物と本化合物の反応溶液を HPLC で直接比較することで、それぞれ D-グルコース、D-キシロースであると確認した (図 6-1、6-2、D-グルコース: 10.41 分、L-グルコース: 9.61 分、D-キシロース: 12.03 分、L-キシロース: 11.22 分、化合物 12: 10.59、12.19 分)。以上の諸データより、PH-1 の構造を 12 式に示すように決定した。

3. 添加物製品の分析

モウソウチク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 に示す

チャートが得られた。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 *p*-coumaric acid (3)、3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside (9)、lyoniresinol 9'-*O*-glucoside (11) であることが明らかとなった。一方、既存添加物名簿記載の主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone はマイナー成分として検出された

D. 考察

今回の成分精査の結果、フェニルプロパノイド、フェノール類、リグナン、及びそれらの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 *p*-coumaric acid、3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside、lyoniresinol 9'-*O*-glucoside であることを明らかにした。一方、既存添加物名簿において主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は本製品中には微量しか検出されなかった。

E. 結論

製造用剤として既存添加物名簿に収載されている「モウソウチク抽出物」の品質規格作成に供する化学的検討として、モウソウチク抽出物製品中の含有成分について精査した結果、11 種の既知化合物 [5-hydroxymethyl-2-furfural、4-hydroxybenzoic acid、*p*-coumaric acid、*trans*-ferulic acid、*N,N'*-diferuloylputrescine、arbutin、tachioside、isotachioside、3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside、koaburaside、lyoniresinol 9'-*O*-glucoside] 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 *p*-coumaric acid、3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside、lyoniresinol 9'-*O*-glucoside の 3 種であった。一方、既存添加物モウソウチク抽出物の主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone については微量しか検出されなかった。

[参考文献]

- 1) Choi S.W., Lee S.K., Kim E.O., Oh J.H., Yoon K.S., Parris N., Hicks K.B., Moreau R.A., Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 3920-3925, 2007.
- 2) Pedras M.S., Zheng Q.A., Metabolic responses of *Thellungiella halophila/salsuginea* to biotic and abiotic stresses: Metabolite profiles and quantitative analyses, *Phytochemistry*, **71**, 581-589, 2010.
- 3) Tschesche R., Harz, A., Wulff, G., 3,4'-Dihydroxypropiofenone-3-β-D-glucopyranoside from *Betula alba*, *Phytochemistry*, **13**, 518-519, 1974.
- 4) Wen Q., Lin X., Liu Y., Xu X., Liang T., Zheng N., Kintoko, Huang R., Phenolic and Lignan Glycosides from the Butanol Extract of *Averrhoa carambola* L. Root, *Molecules*, **17**, 12330-12340, 2012.
- 5) Dada G., Corbani A., Lignan Glycosides from the Heartwood of European Oak *Quercus petraea*, *J. Nat. Prod.*, **52**, 1327-1330, 1989.
- 6) Tanaka T., Nakashima T., Ueda T., Tomii K., Kouno I., Facile Discrimination of Aldose Enantiomers by Reversed-Phase HPLC, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 899-901, 2007.

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
なし

H. 健康危機情報
なし

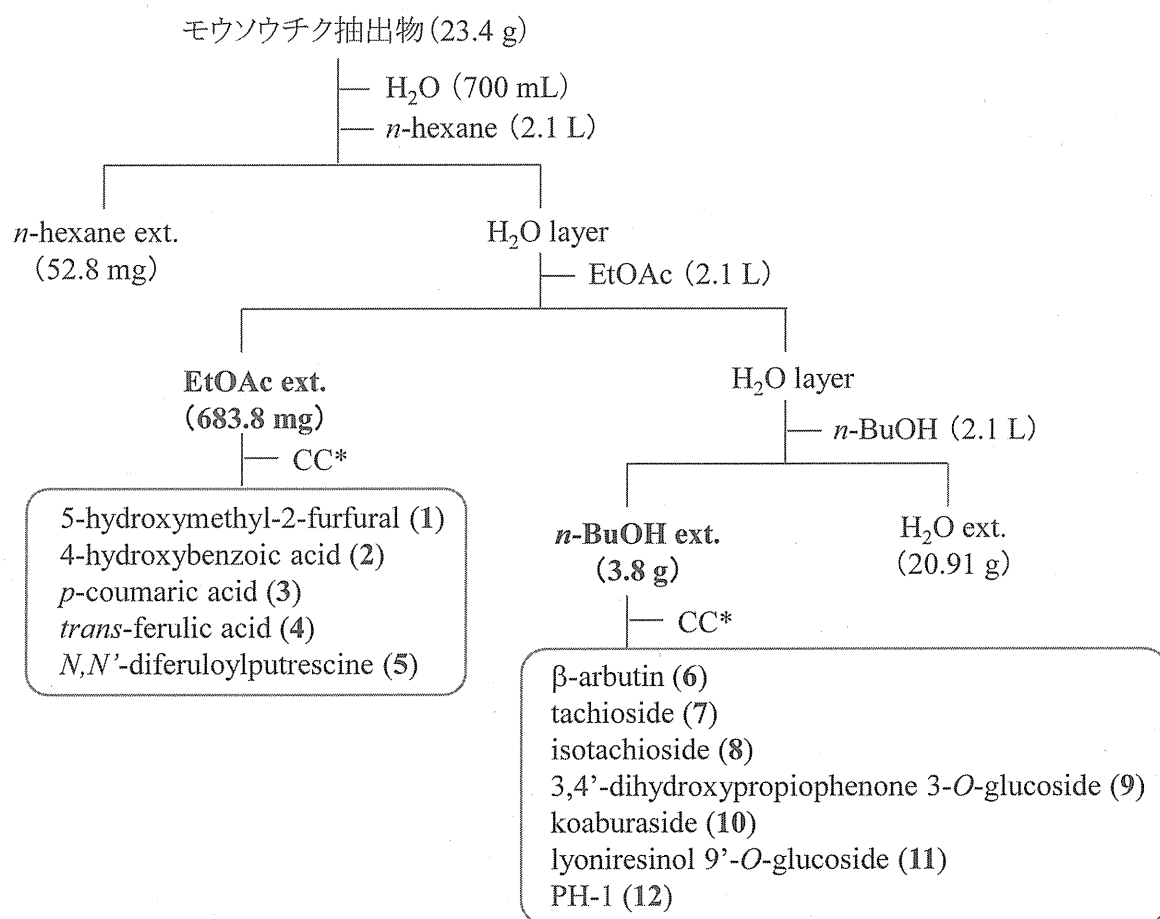


図 1. 抽出，分画のフローチャート

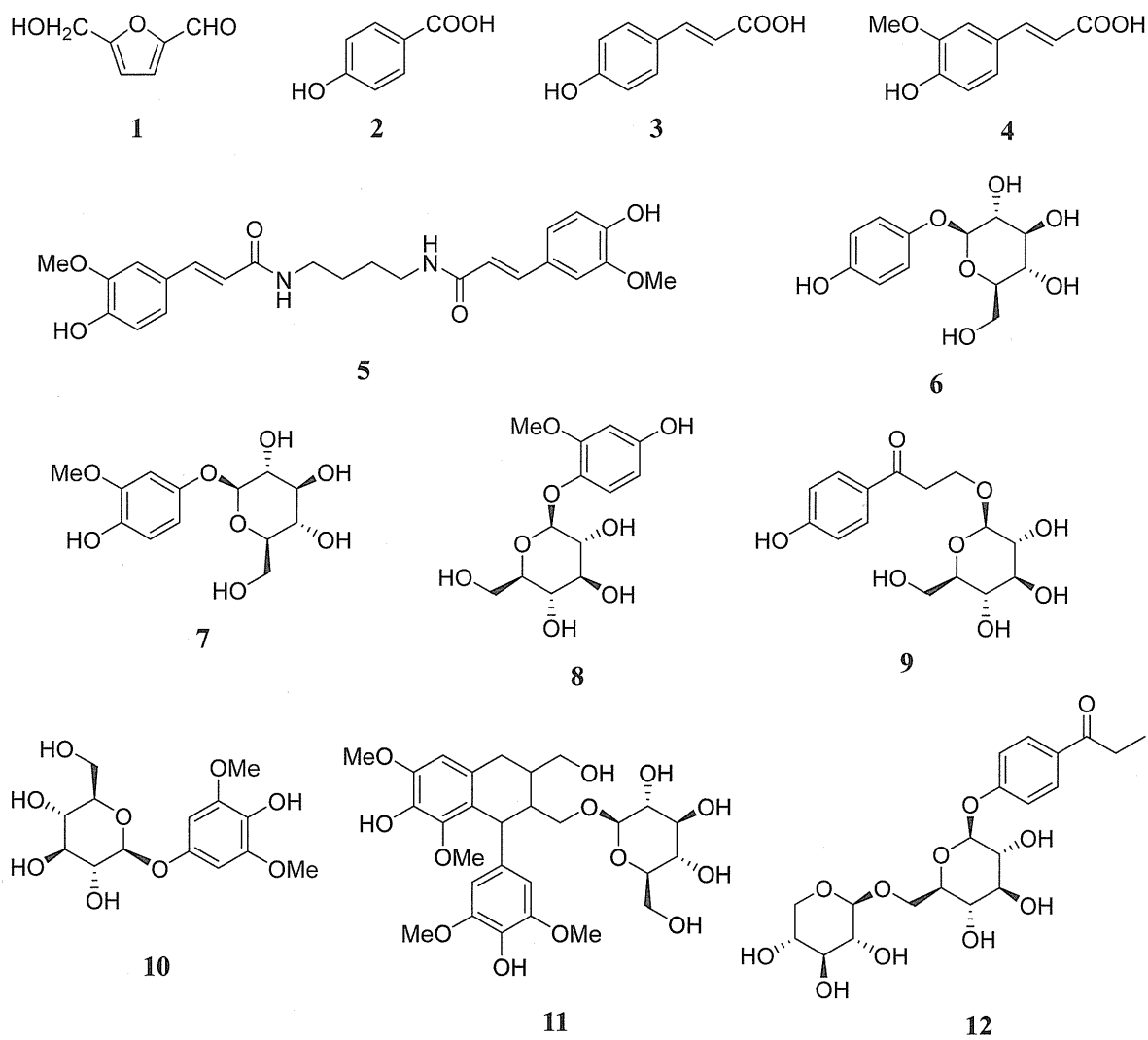
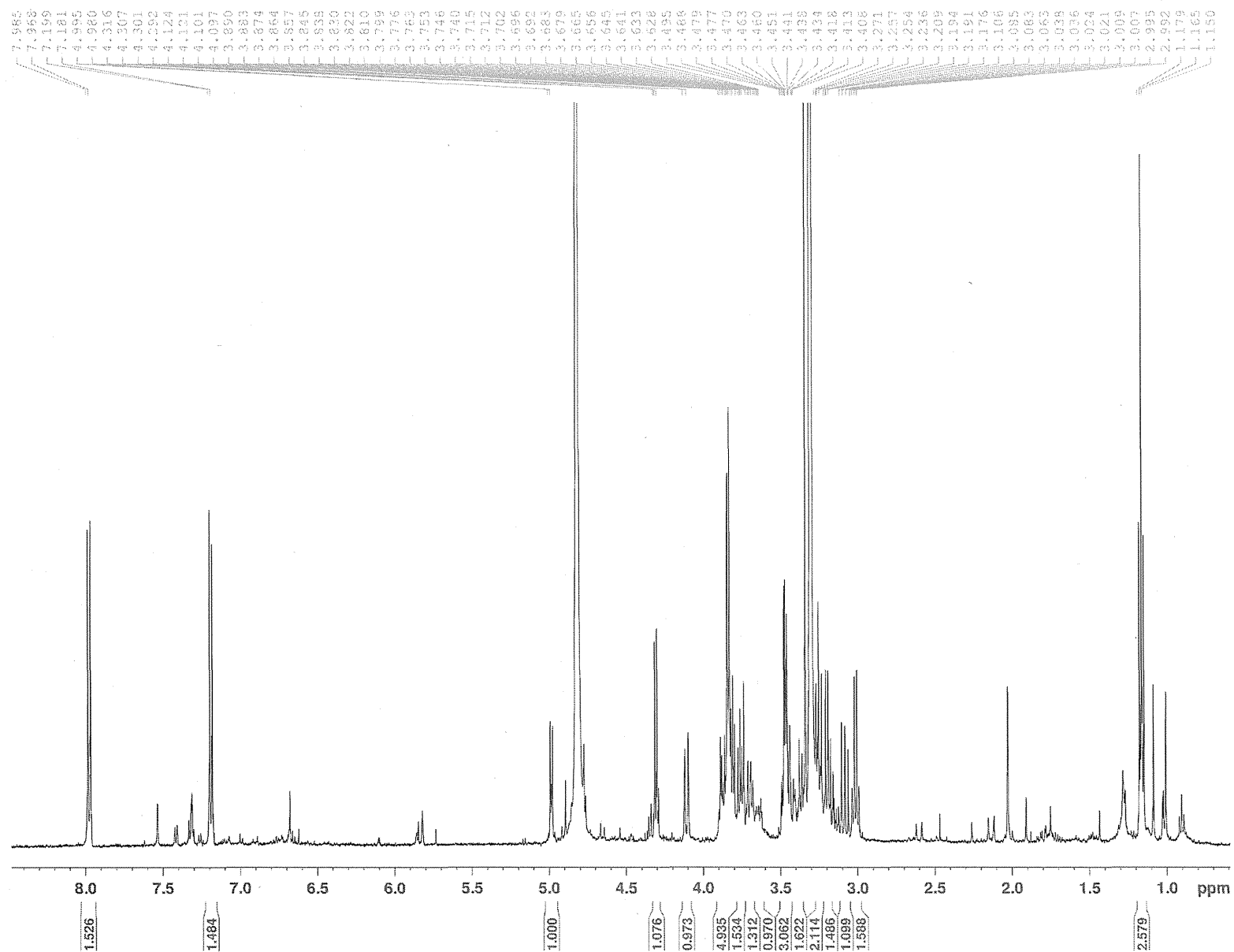


図 2. 化合物 1~12 の化学構造



☒ 3. ^1H -NMR spectrum of PH-1 (12)