

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27年度研究分担報告書

研究分担課題：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

研究分担者 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。平成26年度は、10種の化合物〔3-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid、5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)、3-*O*-feruloylquinic acid、4-*O*-feruloylquinic acid、5-*O*-feruloylquinic acid、caffeine、3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid、*trans-p*-coumaroyl-L-tryptophan〕を単離、同定し報告した。今年度は新たに、4種の化合物〔3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid、ethyl chlorogenate、3-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid、*trans*-caffeoyl-L-tryptophan〕を単離、同定することができた。一方で、得られた各画分及び化合物について、DPPHラジカル消去活性を指標に酸化防止効果を検討した結果、活性の強かった画分から、5-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid が検出され、これらカフェー酸誘導体が添加物活性への寄与に大きく影響していることが示唆された。

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

#### 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し、品質規格作成のための基礎的データの集積を目的とした検討を実施しており、今年度は製品中のさらなる成分精査と、酸化防止効果の指標として DPPH ラジカル消去活性を評価し、有効成分の検討を実施した。

#### B. 研究方法

##### 1. 試料及び試薬

試料とした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)、MCI-gel CHP-20P (三菱化学) を用いた。Caffeine、chlorogenic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid、3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid、4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid はシグマ製を用いた。1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl はアルドリッチ製を、また trolox は和光純薬製を用いた。その他の試薬はすべて特級又は高速液体クロマトグラフィー用を使用した。

## 2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は、Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。測定条件を下記に記す。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) (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz、<sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒としてメタノール-*d*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H: 3.30 ppm、<sup>13</sup>C: 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。分光光度計は、Shimadzu UV mini-1240 (島津製作所製) を使用した。

## 3. 分画物の調製及び化合物の単離

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) をカラムクロマトグラフィー (YMC gel ODS-AQ、Sephadex LH-20、Chromatorex ODS、MCI-gel CHP 20P) による分離・精製を繰り返し、化合物の単離を

行った。活性評価に使用した分画物は、濃縮物 (1回目) を YMC gel ODS-AQ カラムクロマトグラフィーにより分画した画分 (画分①~⑪: ①水溶出部 1、②水溶出部 2、③5%メタノール溶出部 1、④5%メタノール溶出部 2、⑤10%メタノール溶出物、⑥15%メタノール溶出物、⑦20%メタノール溶出物、⑧30%メタノール溶出物、⑨40%メタノール溶出物、⑩50%メタノール溶出物、⑪メタノール溶出部) を使用した。単離した化合物については HPLC による標品との直接比較、あるいは文献値を NMR データ等の機器分析データと比較することにより同定した。

## 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、上述した条件で HPLC 分析を行った。また、新たに単離した各化合物についても同条件で分析を行い、製品中の化合物組成のプロファイリングを行った。

## 5. DPPH ラジカル消去活性の評価

試料溶液 (200 μL) に 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) (800 μL)、0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) エタノール溶液 (1 mL) を加え、10 秒間振とう後、暗所で 30 分間放置し、吸光度 (517 nm) を測定した。試料溶液のかわりにエタノールを添加した時の吸光度をコントロールとし、DPPH 溶液のかわりにエタノールを添加したものをブランクとした。コントロールの吸光度に対する試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を算出した。また、trolox の IC<sub>50</sub> を求め、TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) を算出した。

## 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、これまで単離、同定した 10 種の化合物に加え、3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (1) (11.3 mg)、ethyl chlorogenate (2) (8.8 mg)、

3-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid (3) (8.9 mg)、*trans*-caffeoyl-L-tryptophan (4) (59.4 mg) を新たに単離、同定し、標品とした。単離、同定した化合物の NMR データを以下に記す。

3,5-Di-*O*-caffeoylquinic acid (1): <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.60, 7.57 (each 1H, d, *J*=16, H-7', 7''), 7.06, 7.05 (each 1H, d, *J*=2, H-2', 2''), 6.95 (2H, brd, *J*=8.5, H-6', 6''), 6.77 (2H, d, *J*=8), 6.35, 6.25 (each 1H, d, *J*=16, H-8', 8''), 5.40 (2H, m, H-3, 5), 3.95 (1H, dd, *J*=3.5, 8 Hz, H-4), 2.12-2.32 (2H, m, H-2, 6).

Ethyl chlorogenate (2) : <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.53 (1H, d, *J*=16, H-7'), 7.03 (1H, d, *J*=2, H-2'), 6.93 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6'), 6.77 (1H, d, *J*=8, H-5'), 6.21 (1H, d, *J*=16, H-8'), 5.27 (1H, m, H-5), 4.13 (3H, m, H-3, -CH<sub>2</sub>-), 3.72 (1H, dd, *J*=3, 7.5, H-4), 1.98-2.21 (4H, m, H-2, 6), 1.23 (3H, t, *J*=7, CH<sub>3</sub>-).

3-*O*-Feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid (3): <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.63 (1H, d, *J*=16), 7.60 (1H, d, *J*=16) [H-7', 7''], 7.20 (1H, d, *J*=2), 7.09 (1H, dd, *J*=2, 8.5), 7.05 (1H, d, *J*=2), 6.95 (1H, dd, *J*=2, 8.5) [H-2', 2'', 5', 5'', 6', 6''], 6.34 (1H, d, *J*=16), 6.33 (1H, d, *J*=16) [H-8', 8''], 5.43 (1H, m, H-5), 5.40 (1H, m, H-3), 3.97 (1H, dd, *J*=3.5, 7.5, H-4), 3.89 (3H, s, -OMe), 2.33-2.12 (4H, m, H-2, 6). <sup>13</sup>C-NMR δ: 177.5 (C-7), 168.9, 168.3 (C-9', 9''), 150.7, 149.5, 149.4, 147.1, 147.0, 146.9, 128.0, 127.8 (C-1', 1'', 3', 3'', 4', 4'', 7', 7''), 124.0, 123.0, 116.5 (2C), 115.6, 115.5, 115.2, 111.8 (C-2', 2'', 5', 5'', 6', 6'', 8', 8''), 74.8 (C-1), 72.6 (C-5), 72.2 (C-3), 70.8 (C-4), 56.5 (-OMe), 37.8, 36.0 (C-2, 6).

*trans*-Caffeoyl-L-tryptophan (4): <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.57 (1H, d, *J*=7.5, H-4), 7.35 (1H, d, *J*=16, H-7'), 7.30 (1H, d, *J*=8, H-7), 7.09 (1H, s, H-1), 7.06 (1H, brt, *J*=7, H-6), 6.99 (1H, d, *J*=7.5, H-5), 6.97 (1H, d, *J*=2, H-2'), 6.87 (1H, dd, *J*=2, 8, H-6'), 6.73 (1H, d, *J*=8, H-5'), 6.39 (1H, d, *J*=16, H-8), 4.80 (1H, m, H-10), 3.39 (1H, dd, *J*=5, 15, H-9a), 3.23 (1H, dd, *J*=7.5, 15, H-9b). <sup>13</sup>C-NMR δ: 175.4 (C-11), 169.1 (C-9'), 148.8 (C-4'), 146.6 (C-3'), 142.8 (C-7'), 138.0 (C-8), 128.8 (C-3), 128.3 (C-1'), 124.4 (C-1), 122.4, 122.3 (C-6, 6'), 119.8

(C-5), 119.3 (C-4), 118.0 (C-8), 116.4 (C-5'), 115.1 (C-2'), 112.2 (C-7), 111.0 (C-2), 54.9 (C-10), 28.6 (C-9).

## 2. 生コーヒー豆抽出物の HPLC 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 に示すクロマトグラムが得られた。今回新たに単離した各化合物を標品として同条件で分析し、4 化合物のデータを加えた。

## 3. DPPH ラジカル消去活性の評価

生コーヒー豆抽出物より得られた分画物①～⑩について、DPPH ラジカル消去活性を評価した。また、各分画物の添加物への寄与度を考察するため、各分画物の TEAC を求めた。各分画物の活性 (IC<sub>50</sub> 及び TEAC) と、HPLC クロマトグラムを図 2 に示す。全体的に活性が認められたが、特に分画物①～④、⑨～⑩が強い活性を示した。TEAC から添加物における活性寄与度をみると、分画物①が最も大きいことが示された。分画物①の HPLC クロマトグラムをみると、5-*O*-caffeoylquinic acid (クロロゲン酸) が主ピークとして検出し、次いで 3-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid が認められ、これらカフェー酸誘導体が活性成分であることが示唆された。そこで、単離した 10 化合物について、DPPH ラジカル消去活性を評価した。結果を表 1 に示す。5-*O*-caffeoylquinic acid をはじめとするカフェー酸誘導体の活性は強く、一方で feruloyl 基や coumaroyl 基を有する化合物の活性は弱かった。また、主検出成分の一つである caffeine は活性を示さなかった。

## 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。DPPH ラジカル消去活性を指標に酸化防止能を評価した結果、活性の強かった画分には 5-*O*-caffeoylquinic acid (クロロゲン酸)、4-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid が主検出され、これらの添加物活性への寄与が大きいことが示唆された。一方で、単離した 10 化合物についても同

様に DPPH ラジカル消去活性を評価した結果、カフェー酸誘導体は全て強い活性を示した。よって、本添加物は、カフェー酸誘導体の活性への寄与が示唆され、caffeyl 基が活性に大きく影響していることが考察された。

#### E. 結論

酸化防止剤として既存添加物名簿に記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、これまで単離、同定した10種の化合物〔5-*O*-caffeylquinic acid、3-*O*-caffeylquinic acid (chlorogenic acid)、4-*O*-caffeylquinic acid、5-*O*-feruloylquinic acid、4-*O*-feruloylquinic acid、3-*O*-feruloylquinic acid、caffeine、4,5-di-*O*-caffeylquinic acid、3,4-di-*O*-caffeylquinic acid、*trans-p*-coumaroyl-L-tryptophan〕に加え、新たに4種の化合物〔3,5-di-*O*-caffeylquinic acid、ethyl chlorogenate、3-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeylquinic acid、*trans*-caffeyl-L-tryptophan〕を単離、同定した。また、得られた各画分及び化合物について、DPPH ラジカル消去活性を指標に酸化防止能を検討した結果、活性の強かった画分から5-*O*-caffeylquinic acid、4-*O*-caffeylquinic acid、3-*O*-caffeylquinic acid が検出され、これらカフェー酸誘導体が添加物活性への寄与に大きく影響していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

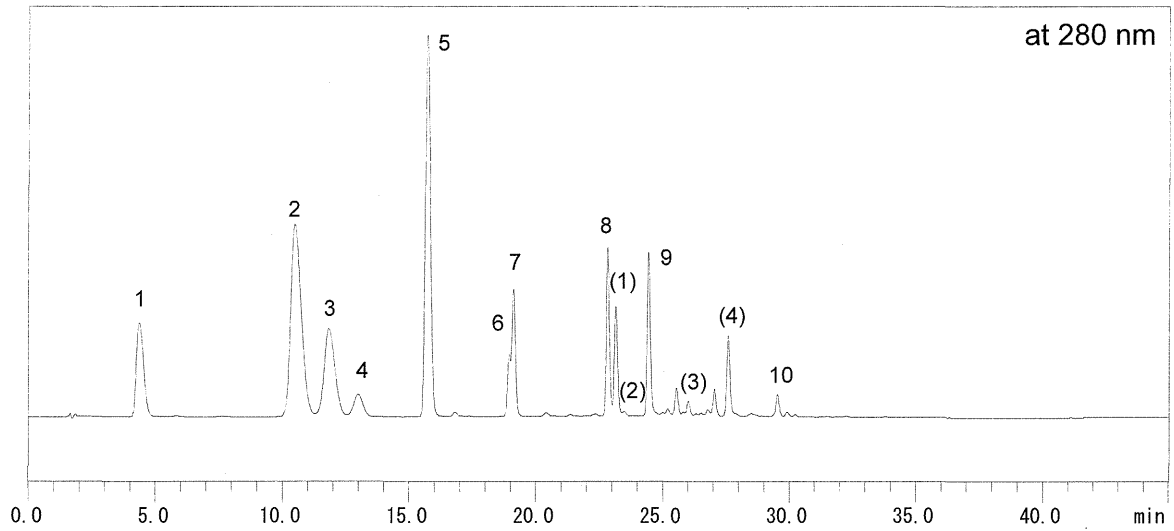
なし

##### 2. 学会発表

1) 吉田晴菜, 杉脇秀美, 好村守生, 島村智子, 受田浩之, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 穂山 浩, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物「生コーヒー豆抽出物」活性画分の成分解析, 第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2015年10月31日(高知)

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. 3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid                       | 7. 5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid                        |
| 2. 5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid<br>(Chlorogenic acid) | 8. 3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid                   |
| 3. 4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid                       | 9. 4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid                   |
| 4. 3- <i>O</i> -Feruloylquinic acid                       | 10. <i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaroyltryptophan           |
| 5. Caffeine   | (1) 3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid                  |
| 6. 4- <i>O</i> -Feruloylquinic acid                       | (2) Ethyl chlorogenate                                     |
|   | (3) 3- <i>O</i> -Feruloyl-5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid |
|   | (4) <i>trans</i> -Caffeoyltryptophan                       |

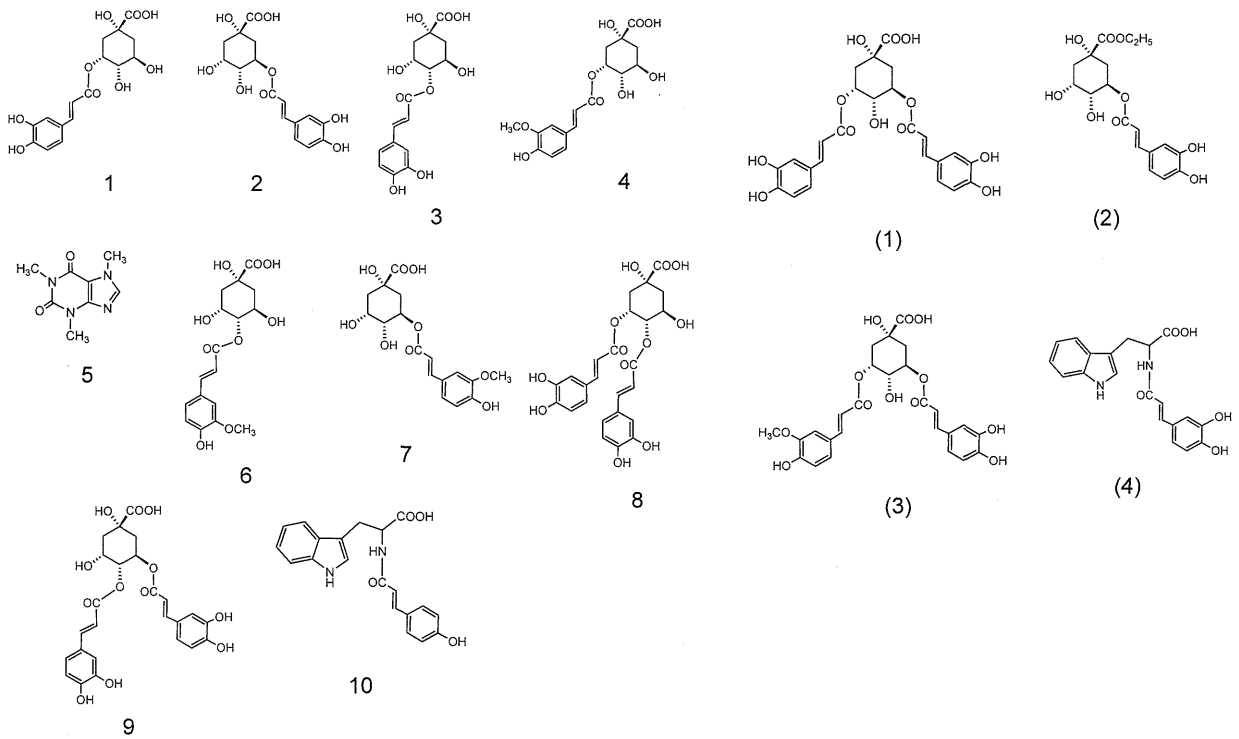
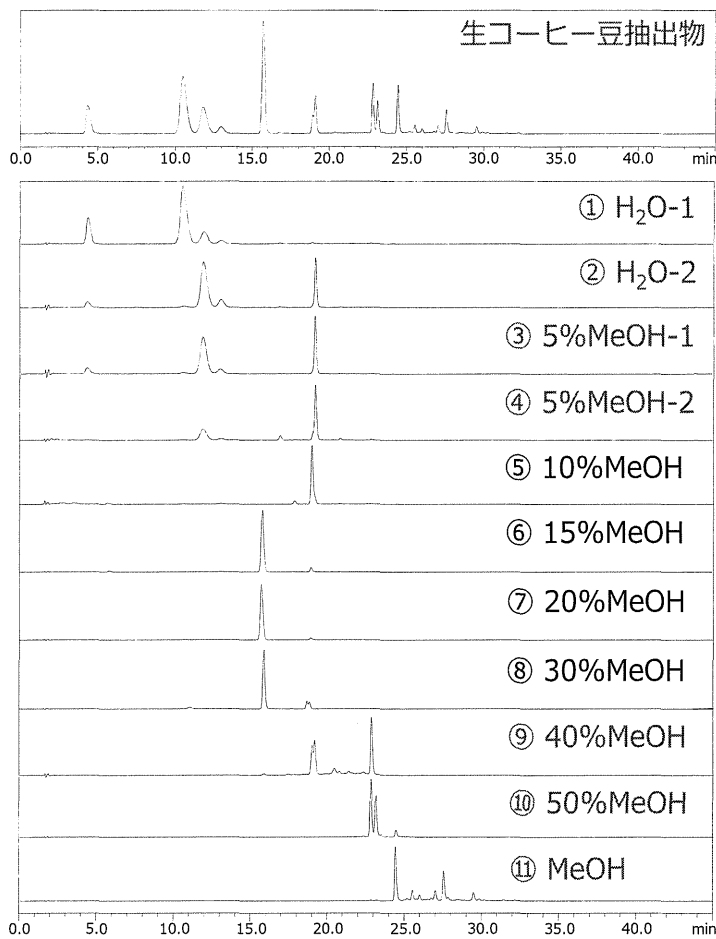


図 1. 生コーヒー豆抽出物の HPLC 成分プロファイリングと化学構造



DPPHラジカル消去活性

IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	各Fr.のTEAC (TEAC $\times$ 収量 : mg TE/Fr.)
73.9	955.0
65.7	<b>526.9</b>
60.7	<u>120.8</u>
58.9	34.2
94.9	13.8
178.3	3.0
762.4	3.4
3245.2	2.4
756.0	4.2
55.8	54.3
59.1	75.6
85.0	<u>116.4</u>

図2. 生コーヒー豆抽出物分画物の HPLC クロマトグラム (280 nm) と DPPH ラジカル消去活性

表 1. 生コーヒー豆抽出物から単離された化合物の DPPH ラジカル消去活性

	IC <sub>50</sub> (μM)
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	83.5
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	88.3
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	84.7
3- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	1094.2
Caffeine	>5000
4- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	1052.1
5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	995.1
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	69.7
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	54.8
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	66.4
<i>trans</i> -Caffeoyltryptophan	83.7
<i>trans-p</i> -Coumaroyltryptophan	1041.4

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27年度研究分担報告書

研究分担課題：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

研究分担者 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、粉砕したものより、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、昨年度から本抽出物製品の含有成分の検討を行っており、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、3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside、koaburaside、lyoniresinol 9'-*O*-glucoside] とともに、新規化合物である propiophenone 4'-*O*-primeveroside [propiophenone 4'-*O*-(6-*O*-β-D-xylopyranosyl)-β-D-glucopyranoside] を単離し、その構造を明らかにしている。また、単離した化合物を標準品としてHPLC分析を行った結果、主要成分として*p*-coumaric acid、3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside、lyoniresinol 9'-*O*-glucosideを認めた一方、本製品中の主要成分として知られている2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinoneはマイナー成分として観察されるのみであったことを報告している。本年度も引き続き成分精査を行った結果、新たに1種の既知化合物 [4'-hydroxypropiophenone] を単離した。また、単離した化合物を標準品としてHPLCによる化合物のプロファイリングを行った。

研究協力者  
好村 守生 松山大学薬学部 講師

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、粉砕したものより、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 YMC GEL ODS-AQ (ワイエムシィ)、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: 280 nm、試料注入量: 3 µL、移動相: (A) 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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・バイオスピ社製) (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒としてアセトン-*d*<sub>6</sub>、メタノール-*d*<sub>4</sub> 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*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H: 2.04 ppm, <sup>13</sup>C: 29.8 ppm)、メタノール-*d*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H: 3.30 ppm, <sup>13</sup>C: 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

26 年度の検討で得られたモウソウチク抽出物の酢酸エチル分画物について、各種カラムクロマトグラフィー [YMC gel ODS-AQ、Chromatorex ODS] による分離、精製を行った。抽出・分画のフローチャートを図 1 に示す。単離した化合物は逆相 HPLC での標品との直接比較及び NMR データの標品との比較によって同定した。

## 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

26 年度の検討で得られたモウソウチク抽出物の酢酸エチル分画物 (586.3 mg/683.8 mg) について、各種カラムクロマトグラフィー [YMC gel

ODS-AQ、Chromatorex ODS] による分離、精製を行った結果、新たに 4'-hydroxypropiophenone (**13**) (1.1 mg) を得た。化合物の同定は逆相 HPLC での標品との直接比較及び NMR データの標品との比較によって行った。

- 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'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside
- 10: koaburaside
- 11: lyoniresinol 9'-*O*-glucoside
- 12: propiophenone 4'-*O*-primeveroside
- 13: 4'-hydroxypropiophenone

各化合物の構造式を図 2 に示す。また、以下に化合物 **13** の機器分析データを記す。

4'-hydroxypropiophenone (**13**): <sup>1</sup>H-NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>) δ: 7.88 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2', 6'), 6.83 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3', 5'), 2.96 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, H-2), 1.15 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-3). <sup>13</sup>C-NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>) δ: 202.2 (C-1), 163.7 (C-4'), 131.7 (2C, C-2', 6'), 129.9 (C-1'), 116.2 (2C, C-3', 5'), 32.1 (C-2), 9.0 (C-3).

### 2. 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 3 に示すチャートが得られた。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'-dihydroxypropiophenone 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

成分精査の結果、モウソウチク抽出物の酢酸エチル分画物から新たに1種の化合物を単離した。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記載されている「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、12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、4'-hydroxypropiofenone] とともに、新規化合物 propiofenone 4'-*O*-primeveroside [propiofenone 4'-*O*-(6-*O*-β-D-xylopyranosyl)-β-D-glucopyranoside] 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。

#### F. 研究発表

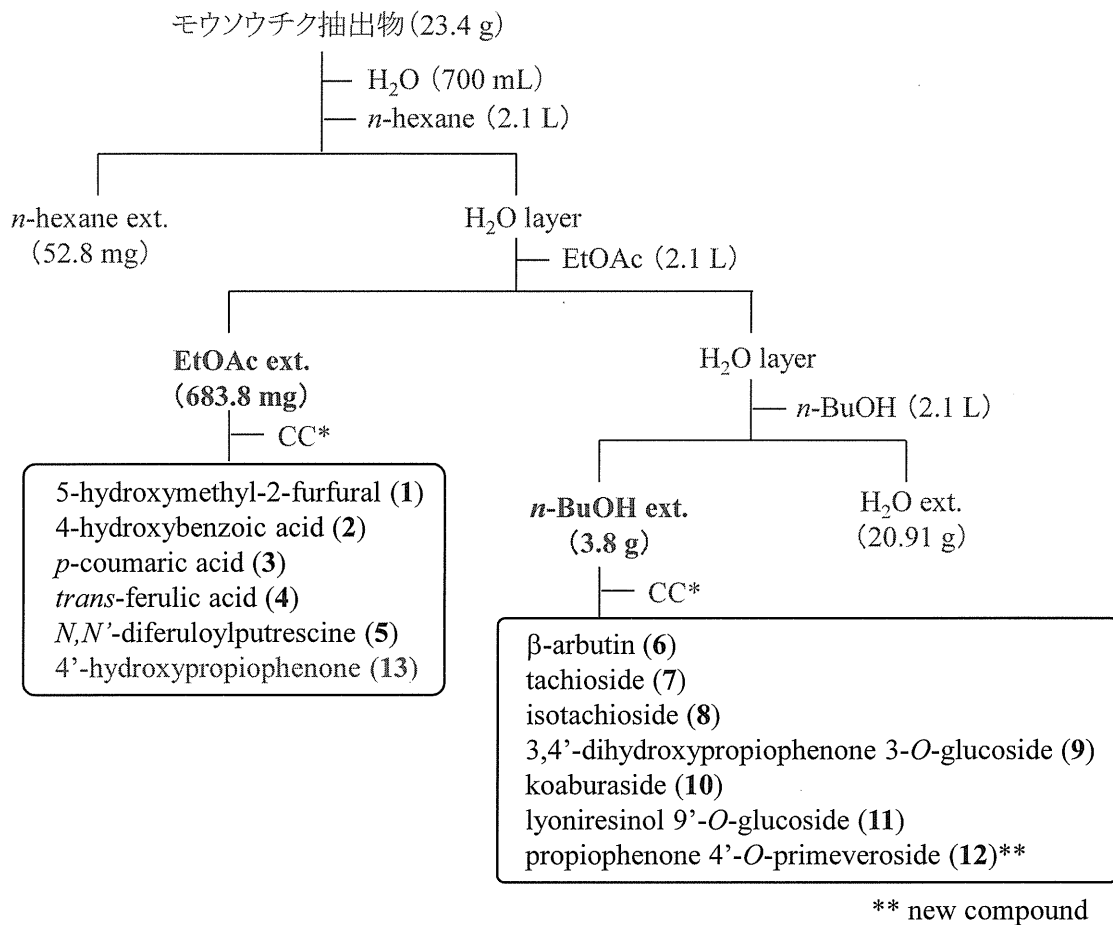
1. 論文発表  
なし

#### 2. 学会発表

1) 好村 守生, 越智 啓介, 多田 敦子, 杉本 直樹, 穂山 浩, 天倉 吉章, 既存添加物「モウソウチク抽出物」の成分研究, 日本生薬学会第 62 回年会, 2015 年 9 月 11 日 (岐阜)

G. 知的財産権の出願, 登録状況  
なし

H. 健康危機情報  
なし



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

図 1. 抽出, 分画のフローチャート

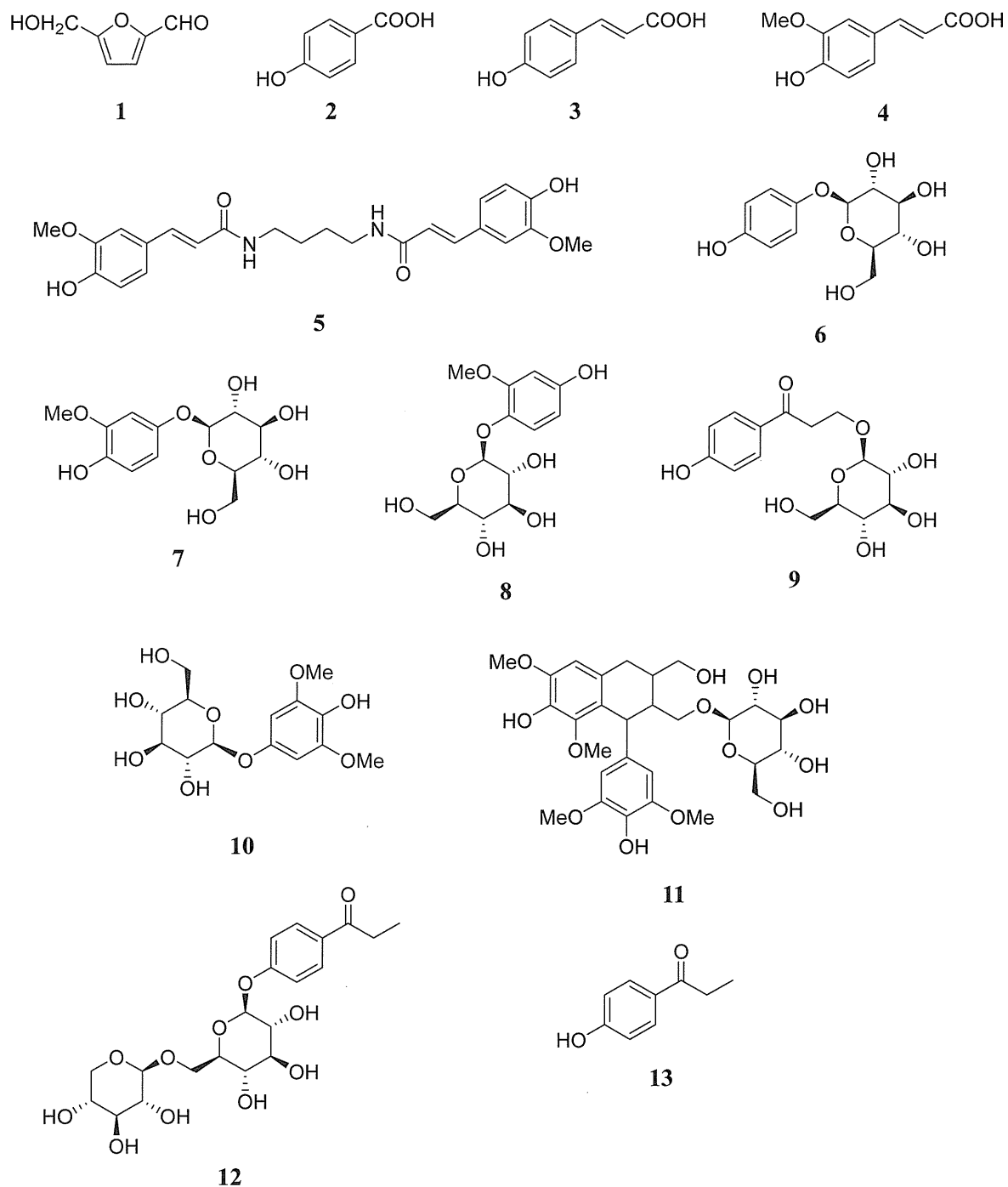


図 2. 化合物 1~13 の化学構造

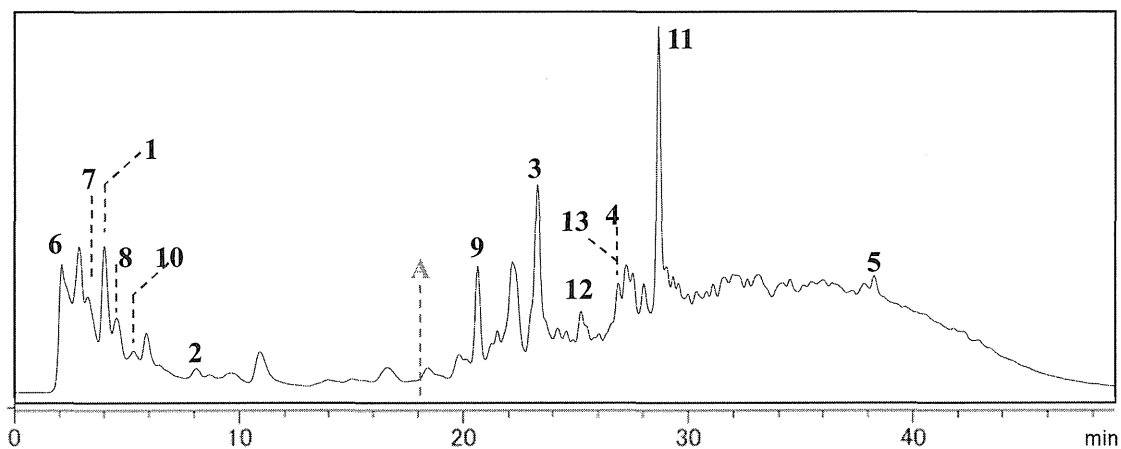


図 3. モウソウチク抽出物製品の HPLC クロマトグラム (UV 280 nm)

- 1: 5-hydroxymethyl-2-furfural, 2: 4-hydroxybenzoic acid, 3: *p*-coumaric acid  
 4: *trans*-ferulic acid, 5: *N,N'*-diferuloylputrescine, 6:  $\beta$ -arbutin, 7: tachioside  
 8: isotachioside, 9: 3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside, 10: koaburaside,  
 11: lyoniresinol 9'-*O*-glucoside, 12: propiophenone 4'-*O*-primeveroside,  
 13: 4'-hydroxypropiophenone, A: 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone

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27年度研究分担報告書

研究分担課題：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

研究分担者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物カキ色素の成分研究

要旨 既存添加物名簿記載のカキ色素は「カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたもの」とされ、主色素はフラボノイドで赤褐色を呈する。本研究では、カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、本製品の含有成分の分離・精製を行った。現時点では化合物の単離に至っていないが、HPLC分析において複数のピークを認める画分を得ており、今後の精査でそれら成分の詳細を明らかにする予定である。また、HPLC分析から本製品には構造不特定の縮合型タンニン類が豊富に含まれることが示唆されたことから、その詳細についても検討を行う予定である。

研究協力者  
好村 守生 松山大学薬学部 講師

A. 研究目的

既存添加物名簿記載のカキ色素は「カキの果実から得られた、フラボノイドを主成分とするもの」とされ、着色料として用いられる。また、その基原・製法・本質は、「カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたもの」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

試料となるカキ色素製品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）、Sephadex LH-20（GEヘルスケア・ジャパン）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: 280 nm、試料注入量: 3 µL、移動相: (A) 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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%)]。

3. 分離・精製

カキ色素製品に蒸留水を加えて溶解させた後、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。得られた水分画物

の一部を予試験的に Diaion HP-20 及び Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによる分離を行った結果、Sephadex LH-20 を用いた場合において比較的良好な分離が得られた。

#### 4. カキ色素の HPLC 分析

カキ色素製品を水に溶解させ、上記条件で HPLC 分析を行った。また、分離した各分画物についても同条件で分析を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 化合物の分離・精製

カキ色素製品 (47.38 g) に蒸留水 1 L を加えて溶解させた後、酢酸エチル (1 L×3)、*n*-ブタノール (1 L×3) で順次分配を行い、各分画物 [酢酸エチル分画物 (129.4 mg)、*n*-ブタノール分画物 (773.6 mg)、水分画物 (45.38 g)] を得た。各分画物の HPLC チャートを図 1 に示す。得られた水分画物のうち 500 mg を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、水→10%メタノール→20%メタノール→30%メタノール→50%メタノール→メタノールで順次溶出させた後、得られた各分画物を上記 HPLC 条件にて分析を行ったが、良い分離は得られなかった

(図 2)。そこで水分画物 (500 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出させて得られた画分について HPLC 分析を行った。その結果、比較的良好な分離が認められたため、水分画物 20 g を用いて Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによる分離を行った。得られた各分画物の HPLC チャートを図 3 に示す。水溶出部の fr.38-52 (1.04 g)、fr.53-57 (50.0 mg)、fr.58-65 (15.4 mg) では複数のシャープなピークを認めたため、それらの画分について今後更なる精製を行う予定である。

### D. 考察

カキ色素製品の液-液分配及びカラムクロマトグラフィーによる分離によって、水分画物から複数のシャープなピークを認める画分を得た。一方、カキ色素製品の HPLC 分析においてブロードなバックグラウンドを認めたことから、本製品には構造不特定の縮合型タンニン類が非常に多く含まれると考えられる。

### E. 結論

着色料として既存添加物名簿に記載されている「カキ色素」の品質規格作成に供する化学的検討として、カキ色素製品の成分精査を行った。現時点で複数のピークを認める画分が得られており、今後の検討でそれら成分の詳細を明らかにする予定である。また、本製品には構造不特定の縮合型タンニン類が豊富に含まれることが HPLC 分析から示唆されることから、その詳細についても検討を行う予定である。

### 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

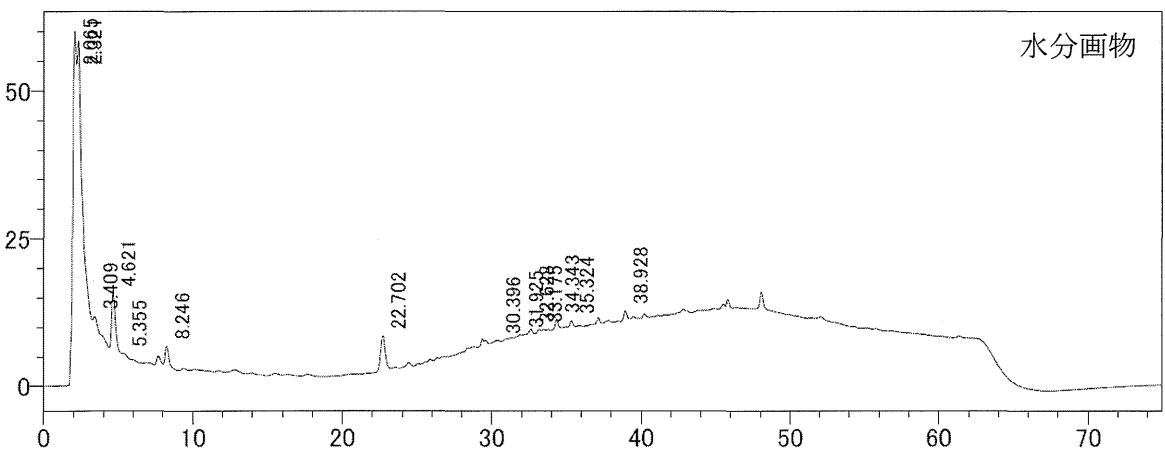
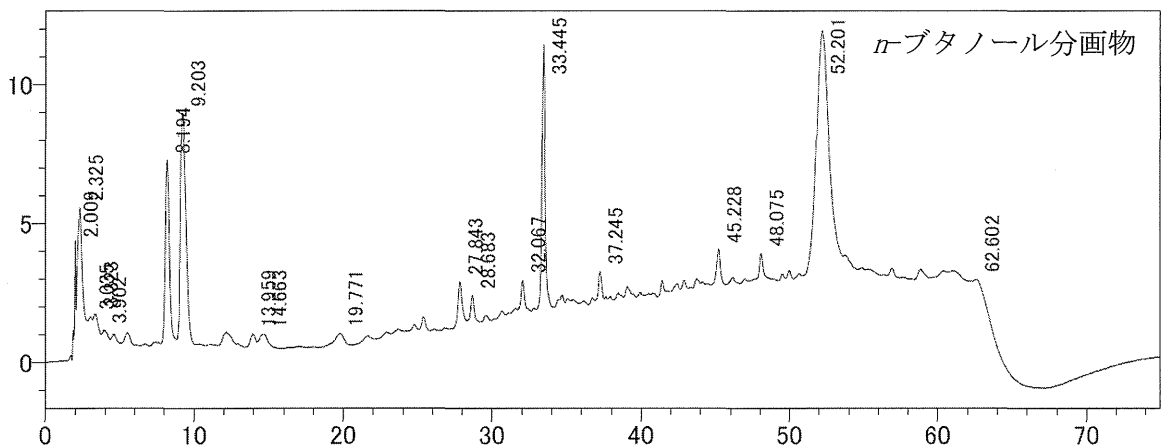
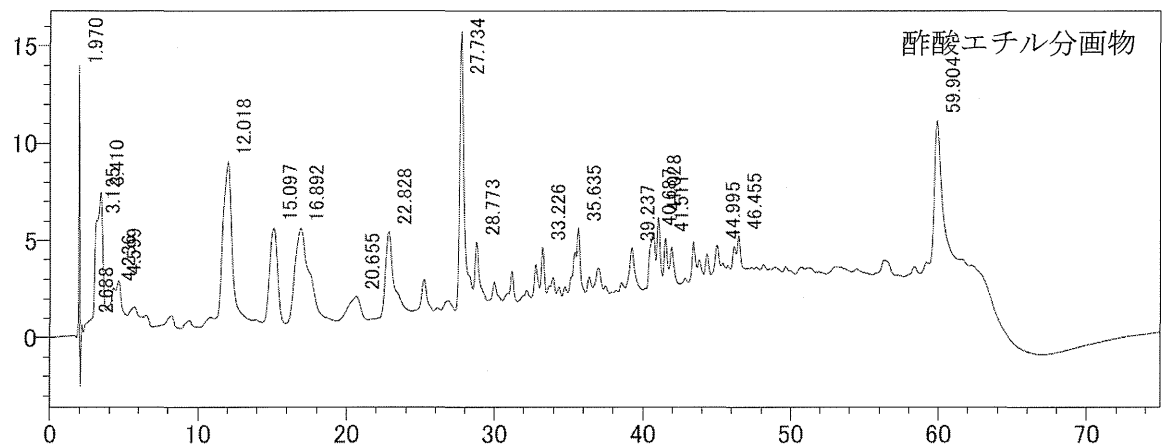
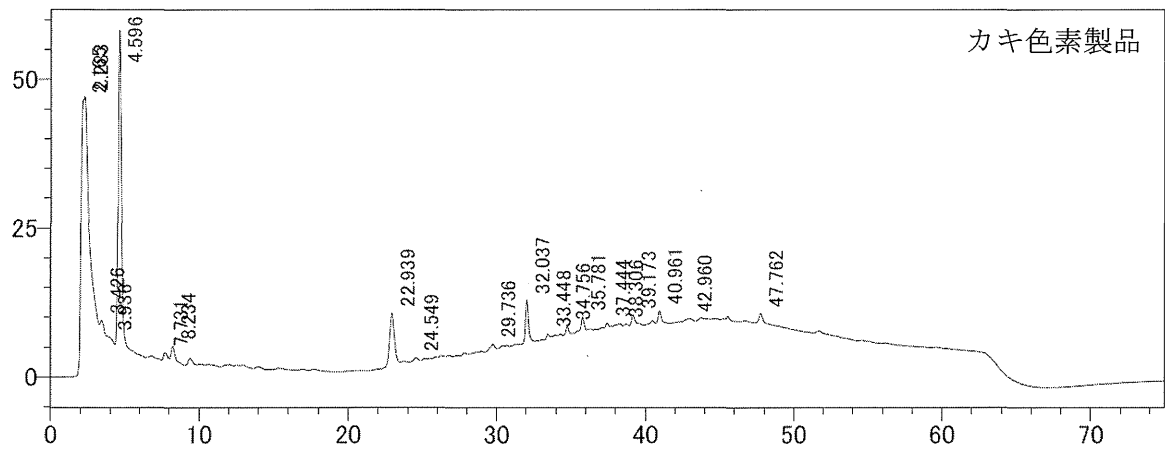


図1. カキ色素分画物のHPLCチャート



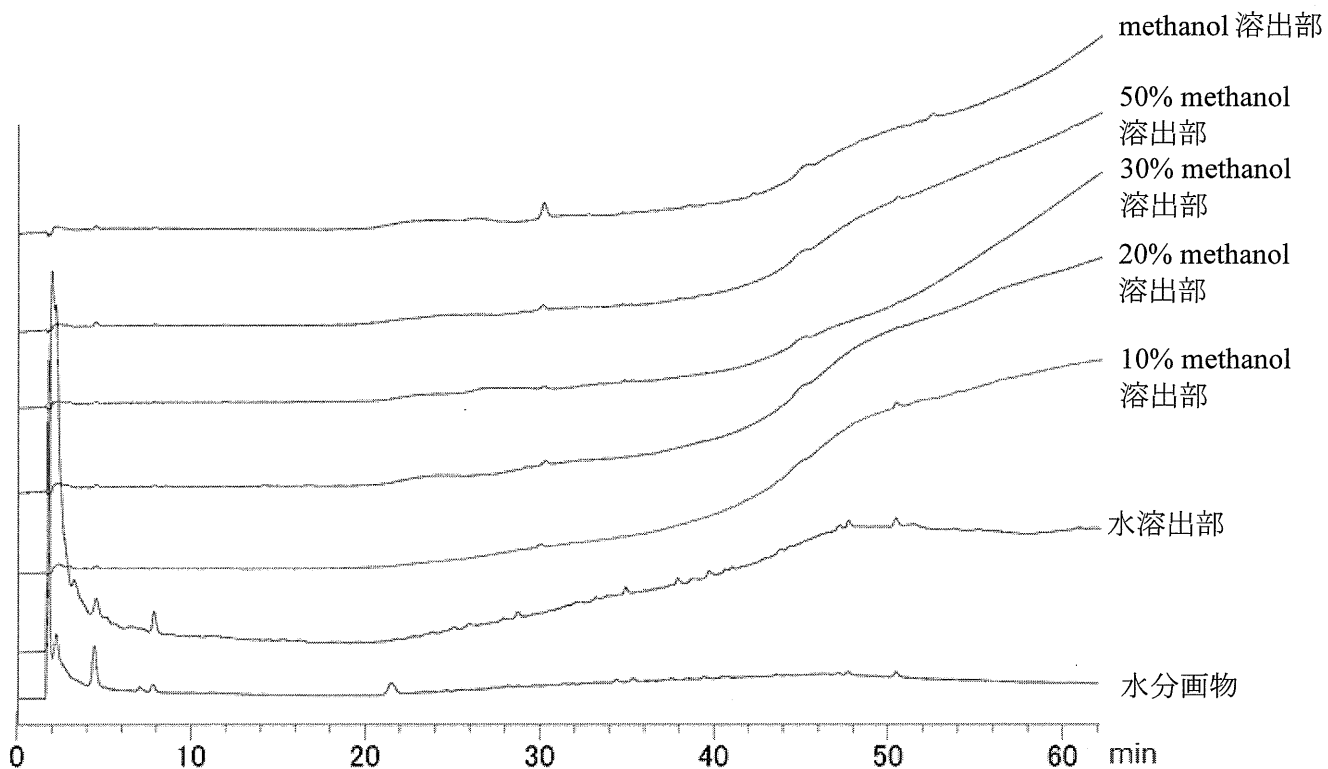


図 2. カキ色素\_水分画物\_Diaion HP-20 分画物の HPLC チャート

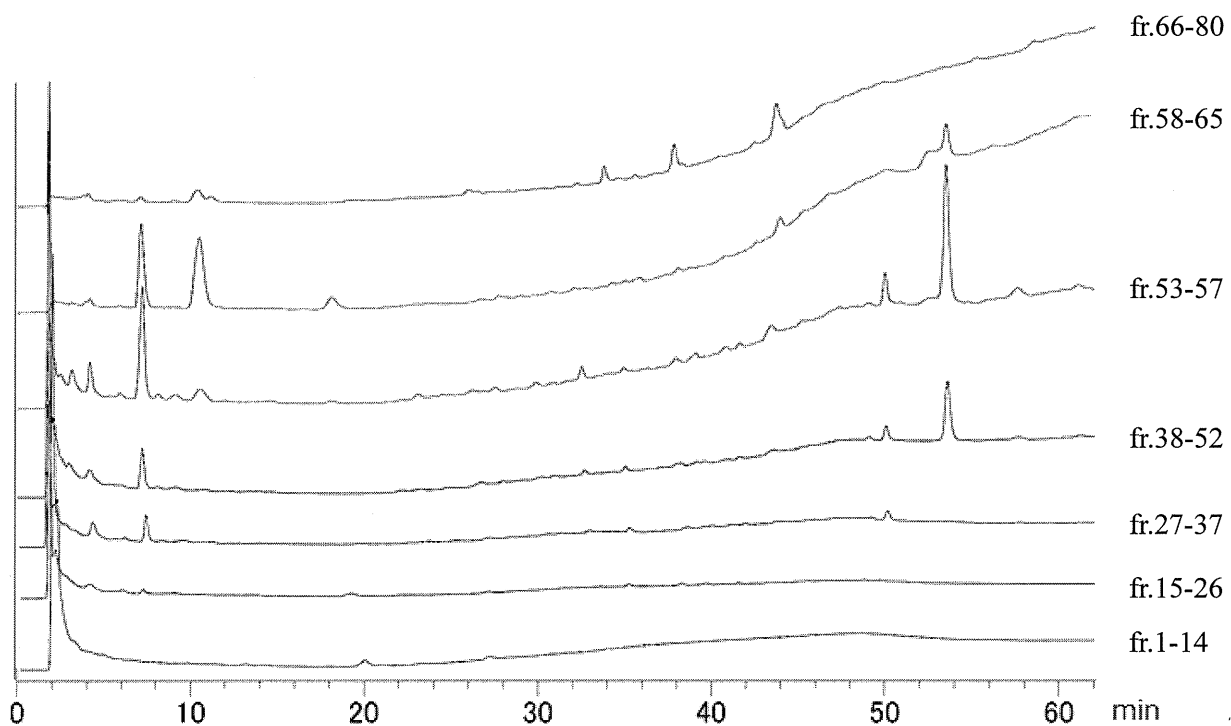


図 3. カキ色素\_水分画物\_Sephadex LH-20 分画物の HPLC チャート

別添

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保促進研究事業）  
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  
平成 27 年度分担研究報告書

既存添加物カワラヨモギ抽出物の乾燥減量試験法と qNMR を応用した定量法の開発

研究分担者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 室長

研究要旨 既存添加物製品の規格の設定は、品質や安全性確保の上から極めて重要である。既存添加物カワラヨモギ抽出物は、天然由来の保存料であり、抗菌作用があるとされている。本研究では、既存添加物カワラヨモギ抽出物の公的成分規格作成のため、本品目に適した乾燥減量試験法及び定量 NMR を応用した LC 定量法の開発を行った。

研究協力者

加藤智久 国立医薬品食品衛生研究所  
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所  
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

既存添加物カワラヨモギ抽出物（英名：Rumpup roman extract）は、既存添加物名簿<sup>1)</sup>に収載されている保存料の1つで、その定義は、『カワラヨモギの全草から得られた、カピリン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<sup>2)</sup>の基原・製法・本質には、『キク科カワラヨモギ（*Artemisia capillaris* THUNB.）の全草より、室温時エタノール若しくは含水エタノールで抽出して得られたもの、又は水蒸気蒸留して得られたものである。有効成分はカピリン等である。』と記載されている。既存添加物カワラヨモギ抽出物は、食品添加物公定書<sup>3)</sup>未収載であり、今後成分規格を作成する必要があるため、乾燥減量試験法やカピリン

（capillin）（Fig. 1）の定量法の検討が必要である。カワラヨモギ抽出物は主にエタノールで抽出した液体状態で流通しており、粉末製品等と異なり、乾燥減量の測定方法に工夫が必要である。また、抗菌活性成分として挙げられているカピリン（capillin）の定量法を検討する必要があるが、その含量は微量であることが予想され、多くの夾雑物の中から選択的に検出するために、他の物質と十分分離可能な LC 条件を検討する必要がある。また、カピリンの試薬が市販されておらず、カワラヨモギから単離したカピリンを標品として用いるが、その精確な純度を確認する必要がある。

本研究では、既存添加物カワラヨモギ抽出物流通製品 5 種類を用い、乾燥減量試験法の開発、LC/UV 及び LC/MS による定量法の開発を行った。さらに、定量 NMR（quantitative NMR: qNMR）を応用し、カピリン単離標品の正確な純度を求め、また添加物製品についても、カピリン標品を使用しない qNMR による直接定量を試みた。

## B. 研究方法

### B-1. 試料

既存添加物製品には、日本食品添加物協会を通じて入手した A 社製品 1 (暗褐色)、製品 2 (黄褐色)、製品 3 (黄褐色) 及び製品 4 (黄褐色)、及び B 社製品 5 (赤褐色)、計 5 製品を使用した (Table 1)。またカピリンの単離標品は、A 社標品 (無色結晶) を、日本食品添加物協会を通じて入手した。

### B-2. 試薬

NMR 測定用重溶媒には重クロロホルム (クロロホルム-*d*) (Isotec 社, 型番 151823) を用い、内部標準物質として 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> (1,4-bis(trimethylsilyl)-benzene-*d*<sub>4</sub>) (和光純薬工業 (株), 99.8% ± 0.5%, 型番 024-17031) を用いた。また、qNMR により 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の精確な濃度を定めるために、独立行政法人産業技術総合研究所により国際単位系 (SI) による純度値が付けられた認証標準フタル酸ジエチル (DEP) ((独) 産業技術総合研究所, 99.98% ± 0.01, 型番 639-10081) 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. 試料液の調製

#### B-3-1. LC/UV 及び LC/MS 定量用試料液の調製

カワラヨモギ抽出物製品 1~5, 計 5 製品を定量対象試料とし、検量線の作成には、カピリン単離標品を用いた。標品は、約 10 mg を正確に量り取り、エタノールで 100 mL に定容し (=約 100 µg/mL)、さらに、この液 2 mL, 1 mL 及び 1 mL を正確に取

り、それぞれ 0.1%ギ酸含有アセトニトリル水溶液 (H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN = 1 : 1) で 100 mL, 100 mL 及び 200 mL に定容し (=それぞれ約 2.0, 1.0 及び 0.5 µg/mL)、標準液 1, 2 及び 3 とした。さらに標準液 2 を 2 mL 及び 1 mL 正確に取り、0.1%ギ酸含有アセトニトリル水溶液 (H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN = 1 : 1) でそれぞれ 20 mL に定容し (=それぞれ約 0.1 及び 0.05 µg/mL)、標準液 4 及び 5 とした。即ち、約 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 µg/mL の濃度に正確に調製した 5 濃度の標準液 1~5 を作成した。標準液の調製は各濃度につき n=2 で行った。カワラヨモギ抽出物製品 1~5 は、それぞれ約 0.12, 1.8, 0.97, 0.74 及び 0.59 g を正確に量り取り 0.1%ギ酸含有アセトニトリル水溶液 (H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN = 1 : 1) で 100mL に定容し、LC 定量用試料液とした。製品 5 のみはカピリン含量が高く、標品の検量線の範囲に入る濃度とするにはさらに希釈が必要であったため、製品 5 の液 2 mL を正確に取り、0.1%ギ酸含有アセトニトリル水溶液 (H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN = 1 : 1) で 100mL に定容した (製品の約 6.7~330 倍希釈液に相当) を LC 定量用試料液とした。各製品の試料液の調製は n=3 で行った。なお、カピリン単離標品は、ウルトラマイクロ天秤 : METTLER TOLEDO 社製, No. 11122430, XP2U より、カワラヨモギ抽出物製品は、セミマイクロ天秤 (ザルトリウス・メカトロニクス・ジャパン (株) 製 LE225D) により秤量した。

#### B-3-2. qNMR 用試料液の調製

カピリン単離標品及びカワラヨモギ抽出物製品の qNMR 用試料液の作製には、予め調製した qNMR 標準液を用いた。qNMR 標

準液は、1,4-BTMSB- $d_4$ を量り取り、約0.2 mg/mL 1,4-BTMSB- $d_4$ /クロロホルム- $d$ 溶液としたものを用いた。qNMR標準液における1,4-BTMSB- $d_4$ の正確な純度は、認証標準物質DEPを

用いて校正した。

カピリン単離標品は、約2.7 mgを正確に量り取り、予め調製した上記のqNMR内標準液を1 mL加えて溶解し、qNMR用試料液とし、600  $\mu$ LをNMR管に入れて測定に供した。qNMR用試料液はn=3で調製した。

カワラヨモギ抽出物製品1~5についてはqNMRによるカピリンの定量を行った。まず、試料中のエタノール等の溶媒を除去するため、製品1, 2, 3, 4及び5, それぞれ約0.2, 3.7, 1.7, 1.5及び0.4 gを正確に各ナスフラスコに量り取り、エバポレーター(水浴40 $^{\circ}$ C)により蒸発乾固させた。次に、予め調製した上記のqNMR標準液をそれぞれ1 mLずつ加えて溶解し、0.45  $\mu$ mのフィルター(Merck Millipore社, Millex $^{\circ}$ , SLLHH13NL)を用いてろ過した。各ろ液をqNMR用試料液とし、それぞれ600 $\mu$ LずつNMR管に入れて測定に供した。各試料につきいずれもn=3で調製した。なお、カピリン単離標品は、ウルトラマイクロ天秤(METTLER TOLEDO社製, No. 11122430, XP2U)により、カワラヨモギ抽出物製品は、セミマイクロ天秤(ザルトリウス・メカトロニクス・ジャパン(株)製, LE225D)により秤量した。

#### B-4. 分析方法

##### B-4-1. 乾燥減量試験

以下に示す各種条件で、乾燥減量試験の

検討を行った。

**装置** アスピレーター:アズワン(株)製 DRY ASPIRATOR DAS-01, 定温乾燥器:(株)いすゞ製作所製コスモス ISUZU VTN-III, ドラフト:オリエンタル技研工業(株)製 TALENT シリーズ, 水浴:ADVANTEC社製 TBS1813A, 及びホットプレート:Fisher Scientific社製 Isotemp (184 $\times$ 184 mm)を使用した。

① 秤量瓶及びアスピレーター用いた乾燥減量試験条件

以下の条件で予備濃縮後、乾燥器を用いてさらに乾燥した。

**予備濃縮条件** アスピレーター減圧下(約0.017MPa), 室温(24 $^{\circ}$ C), 5時間30分  
**乾燥条件** 105 $^{\circ}$ C, 5時間

② 秤量瓶, アスピレーター及びドラフトを用いた乾燥減量試験条件

以下の条件で、予備濃縮後、乾燥器を用いてさらに乾燥した。

**予備濃縮条件** アスピレーター減圧下(約0.017MPa), 室温(24 $^{\circ}$ C), 2時間30分 → ドラフト内放置, 室温(24 $^{\circ}$ C), 一晚(13時間45分)

**乾燥条件** 105 $^{\circ}$ C, 5時間

③ ナスフラスコ及びエバポレーターを用いた乾燥減量試験条件

以下の条件で予備濃縮後、乾燥器を用いてさらに乾燥した。

**予備濃縮条件** 水浴(水浴温度40 $^{\circ}$ C), 減圧(約0.007MPa)

**乾燥条件** 105 $^{\circ}$ C, 5時間

④ るつば及び水浴上加熱法を用いた乾燥減量試験条件

以下の条件で予備濃縮後、乾燥器を用いてさらに乾燥した。