

Fig. 5. MS spectra of increased/decreased markers from degradation of infant formula, and standards of nicotinic acid and nicotinamide. LC–MS condition: ESI–TOF/MS positive ion mode. (A) MS spectrum (m/z 50–300) of infant formula from control at retention time (6.2–6.4 min). (B) MS spectrum (m/z 50–300) of nicotinic acid at retention time (6.2–6.4 min). (C) MS spectrum (m/z 50–300) of infant formula from 37 °C condition at retention time (5.1–5.3 min). (D) MS spectrum (m/z 50–300) of nicotinamide at retention time (5.1–5.3 min).

departs from zero, the more it contributes to the difference between the two groups; the Y -axis represents the variable confidence, and the further the unknown compounds, m/z and retention time pair point departs from zero, the higher the confidence level of the ion responses is for the difference between the two groups. This pair points at the two ends of “S” represent those components contributing most to the difference between the two groups with the most confidence, which could be regarded as the most differentiating components. For the extraction of potential markers of the group separation, the cut-off of the variable confidence was approximately 0.9 for the increased markers (red-box) and -0.9 for the decreased markers (blue-box) in the S-plot. This result showed that a total of 144 peaks (increased; 92 peaks, decreased 49 peaks) were analyzed to identify possible marker candidates based on this S-plot. Moreover, these peaks of ion intensity from 37 °C and the control conditions were evaluated by a univariate analysis of the extracted MS chromatograms (Supplementary data, Fig. S-2). From the results of univariate analysis (increase–decrease rate: 80%), the strong candidates were assessed in the degradation of the infant formulas (increased; 31 peaks, decreased 5 peaks). Based on the available metabolomics databases, a list of m/z values is screened by elemental compositions. In this result, we could identify two markers by comparison to database and standard-matching method of nicotinic acid (m/z 124.04) for increased marker and nicotinamide (m/z 123.06) for decreased marker. These MS spectra of the infant formula samples and standards with the same retention times are shown in Fig. 5. This

identification of the increased/decreased possible markers of nicotinic acid and nicotinamide is very interesting for assessment of the infant formula degradation. Nicotinic acid and nicotinamide belong to the classification of vitamin B (Niacin) that is included in infant formula and human milk (Hampel, York, & Allen, 2012; LaCroix et al., 2001; Shin, Kim, & Lee, 2013). Moreover, a recent report of bacterial metabolism in model cheese that each nicotinic acid or nicotinamide is significantly increased and decreased upon incubation at 30 °C for 48 h (Le Boucher et al., 2013). However, nicotinic acid is not a sensible additive to infant formula. Thus, future studies would determine both nicotinic acid and nicotinamide for stable species and formed various kind of infant formula degradation.

4. Conclusions

An LC/MS assay based on HILIC mode for determining the unknown compounds of infant formula based on a multivariate statistical analysis is described. As a result, the origins, types, contaminations and degradations of the infant formulas were possibly evaluated by LC–MS assay and multivariate statistical analysis. However, the identification of various markers from OPLS–DA would require the use of various reference databases, matching-standard method, and future studies to correct the native mass spectra during the MS process. On the other hand, we could identify two markers by comparison to known standards of nicotinic acid and nicotinamide based on the metabolomics databases and standard-matching method. Among them, we can apply a new approach the PCA and OPLS–DA of the LC/MS data from low-molecular-weight compounds for the quality assessment of infant formulas.

Acknowledgements

This work is supported by the Towa Foundation for Food Research 2013 and Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.117>.

References

- Abernethy, G., & Higgs, K. (2013). Rapid detection of economic adulterants in fresh milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1288, 10–20.
- Cevallos-Cevallos, J. M., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2012). Metabolomics in food science. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67, 1–24.
- Cifuentes, A. (2009). Food analysis and foodomics. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7109.
- Friel, S., Hattersley, L., Snowden, W., Thow, A. M., Lobstein, T., & Sanders, D. (2013). Monitoring the impacts of trade agreements on food environments. *Obesity Reviews*, 14, 120–134.
- García-Cañas, V., Simó, C., Herrero, M., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2012). Present and future challenges in food analysis: Foodomics. *Analytical Chemistry*, 84, 10150–10159.
- Hampel, D., York, E. R., & Allen, L. H. (2012). Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC–MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. *Journal of Chromatography B*, 903, 7–13.
- Heller, M. C., Keoleian, G. A., & Willett, W. C. (2013). Toward a life cycle-based, diet-level framework for food environmental impact and nutritional quality assessment: A critical review. *Environmental Science and Technology*, 47, 12632–12647.
- Herrero, M., Simó, C., García-Cañas, V., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2012). Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. *Mass Spectrometry Reviews*, 31, 49–69.

- Hounsomes, N., Hounsomes, B., Tomos, D., & Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73, R48–R65.
- Inoue, K., Obara, R., Hino, T., & Oka, H. (2010). Development and application of an HILIC-MS/MS method for the quantitation of nucleotides in infant formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9918–9924.
- Inoue, K., Sakamoto, T., Min, J. Z., Todoroki, K., & Toyo'oka, T. (2014). Determination of dicyandiamide in infant formula by stable isotope dilution hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 156, 390–393.
- Inoue, K., Tsuchiya, H., Takayama, T., Akatsu, H., Hashizume, Y., Yamamoto, T., et al. (2015). Blood-based diagnosis of Alzheimer's disease using fingerprinting metabolomics based on hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *Journal of Chromatography B*, 974, 24–34.
- Kawachi, Y., Ikegami, T., Takubo, H., Ikegami, Y., Miyamoto, M., & Tanaka, N. (2011). Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5903–5919.
- LaCroix, D. E., Wolf, W. R., Porter, E., Cantelops, D., Chase, G. W., Jr., & Woollard, D. (2001). Determination of niacin in infant formula by solid-phase extraction and anion-exchange liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 84, 789–804.
- Le Boucher, C., Courant, F., Jeanson, S., Chereau, S., Maillard, M. B., Royer, A. L., et al. (2013). First mass spectrometry metabolic fingerprinting of bacterial metabolism in a model cheese. *Food Chemistry*, 141, 1032–1040.
- MacMahon, S., Begley, T. H., Diachenko, G. W., & Stromgren, S. A. (2012). A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods. *Journal of Chromatography A*, 1220, 101–107.
- Marincola, F. C., Noto, A., Caboni, P., Reali, A., Barberini, L., Lussu, M., et al. (2012). A metabolomic study of preterm human and formula milk by high resolution NMR and GC/MS analysis: Preliminary results. *Journal of Maternal Fetal & Neonatal Medicine*, 25, 62–67.
- Rogachev, I., & Aharoni, A. (2012). UPLC-MS-based metabolite analysis in tomato. *Methods in Molecular Biology*, 860, 129–144.
- Roux, A., Lison, D., Junot, C., & Heilier, J. F. (2011). Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry*, 44, 119–135.
- Shin, H., Kim, B., & Lee, J. (2013). Investigation of isotope dilution mass spectrometric (ID-MS) method to determine niacin in infant formula, breakfast cereals and multivitamins. *Food Chemistry*, 138, 1109–1115.
- Tengstrand, E., Rosén, J., Hellenäs, K. E., & Aberg, K. M. (2013). A concept study on non-targeted screening for chemical contaminants in food using liquid chromatography–mass spectrometry in combination with a metabolomics approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 1237–1243.
- Toyo'oka, T. (2008). Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: Application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabonomics, and metabolomics. *Journal of Chromatographic Science*, 46, 233–247.
- Tyan, Y. C., Yang, M. H., Jong, S. B., Wang, C. K., & Shiea, J. (2009). Melamine contamination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 729–735.
- Xin, H., & Stone, R. (2008). Tainted milk scandal. Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine. *Science*, 322, 1310–1311.
- Zhang, W., Xiao, S., & Ahn, D. U. (2013). Protein oxidation: Basic principles and implications for meat quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 1191–1201.

既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分組成の多変量解析に基づく 基原植物種の検討

(2015年6月5日受理)

多田敦子^{1*} 石附京子¹ 杉本直樹¹ 吉松嘉代² 川原信夫²
末松孝子³ 有福和紀⁴ 深井俊夫⁵ 田村幸吉⁶
大槻 崇¹ 田原麻衣子¹ 山崎 壮⁷ 穂山 浩¹

Determination of the Plant Origin of Licorice Oil Extract, a Natural Food Additive,
by Principal Component Analysis Based on Chemical Components

Atsuko TADA^{1,*}, Kyoko ISHIZUKI¹, Naoki SUGIMOTO¹, Kayo YOSHIMATSU², Nobuo KAWAHARA²,
Takako SUEMATSU³, Kazunori ARIFUKU⁴, Toshio FUKAI⁵, Yukiyoishi TAMURA⁶,
Takashi OHTSUKI¹, Maiko TAHARA¹, Takeshi YAMAZAKI⁷ and Hiroshi AKIYAMA¹

¹ National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

² National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition:
1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan;

³ JEOL RESONANCE Inc.: 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan;

⁴ JEOL Ltd.: 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan;

⁵ Yokohama University of Pharmacy, 601 Matano-cho, Totsuka-ku, Yokohama 245-0066, Japan;

⁶ Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.: 14703-10 Mukaihigashi, Onomichi, Hiroshima 722-0062, Japan;

⁷ Jissen Women's University: 4-1-1 Osakaue, Hino, Tokyo 191-8510, Japan;

* Corresponding author

“Licorice oil extract” (LOE) (antioxidant agent) is described in the notice of Japanese food additive regulations as a material obtained from the roots and/or rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis*, *G. inflata* or *G. glabra*. In this study, we aimed to identify the original *Glycyrrhiza* species of eight food additive products using LC/MS. Glabridin, a characteristic compound in *G. glabra*, was specifically detected in seven products, and licochalcone A, a characteristic compound in *G. inflata*, was detected in one product. In addition, Principal Component Analysis (PCA) (a kind of multivariate analysis) using the data of LC/MS or ¹H-NMR analysis was performed. The data of thirty-one samples, including LOE products used as food additives, ethanol extracts of various *Glycyrrhiza* species and commercially available *Glycyrrhiza* species-derived products were assessed. Based on the PCA results, the majority of LOE products was confirmed to be derived from *G. glabra*. This study suggests that PCA using ¹H-NMR analysis data is a simple and useful method to identify the plant species of origin of natural food additive products.

(Received June 5, 2015)

Key words: 食品添加物 food additive; カンゾウ油性抽出物 Licorice oil extract; *Glycyrrhiza glabra*; *Glycyrrhiza inflata*; *Glycyrrhiza uralensis*; 高速液体クロマトグラフィー/質量分析 LC/MS; プロトン核磁気共鳴 ¹H-NMR; 主成分分析 principal component analysis

* atada@nihs.go.jp

¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野賀 1-18-1

² 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所: 〒305-0843 茨城県つくば市八幡台 1-2

³ 株式会社JEOL RESONANCE: 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2

⁴ 日本電子株式会社: 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2

⁵ 横浜薬科大学: 〒245-0066 横浜市戸塚区俣野町 601

⁶ 丸善製薬株式会社: 〒722-0062 広島県尾道市向東町 14703-10

⁷ 実践女子大学: 〒191-8510 東京都日野市大坂上 4-1-1

緒 言

カンゾウ（甘草）は抗炎症作用や抗酸化作用等の生理活性だけでなく、甘味を呈することから、医薬品（生薬）としてだけでなく、化粧品、食品、食品添加物などとして幅広く用いられている天然植物材料である。日本では1996年の食品衛生法改正において、それ以前に使用されていた化学的合成品以外の食品添加物（天然由来の食品添加物）が既存添加物名簿^{*1}に記載された。既存添加物名簿に記載された食品添加物を既存添加物とし、1996年以降も継続してその使用が認められた。カンゾウを基原とする既存添加物には、カンゾウ油性抽出物およびカンゾウ抽出物（それぞれ「カンゾウ油性抽出物」および「カンゾウ抽出物」と表記）がある。「カンゾウ油性抽出物」は、酸化防止剤として使用され、既存添加物名簿^{*1}において、『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』と記載されており、また、既存添加物名簿収載品目リスト^{*2}の基原・製法・本質において、『マメ科ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* FISCHER), マメ科チョウカカンゾウ (*G. inflata* BATALIN) 又はマメ科ヨウカンゾウ (*G. glabra* LINNE) の根また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の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。一方、甘味料として使用される「カンゾウ抽出物」は第8版食品添加物公定書^{*3}に規格が記載されており、『ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer), チョウカカンゾウ (*Glycyrrhiza inflata* Batalin), ヨウカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* Linné), 又はそれらの近縁植物の根若しくは根茎から得られた、グリチルリチン酸を主成分とするものである』と定義されている。すなわち、「カンゾウ油性抽出物」および「カンゾウ抽出物」の両者は抽出法が異なるが、共通の3種の基原植物が定義されている。

一方、第十六改正日本薬局方（日局）^{*4}に記載されているカンゾウ（生薬カンゾウと表記）は、基原植物として *G. uralensis* および *G. glabra* の2種のみが規定されている。生薬カンゾウの基原植物種の確認のため、形態学的な植物の外観、LCプロファイルや成分解析結果を用いた多変量解析、およびNMR測定結果を用いた多変量解析により、産地や基原種の類型化に関する報告がなされている^{1)~14)}。一方、カンゾウを基原とする既存添加物の基原植物種の解析に関する研究報告はなく、その基原植物種に関する情報は非常に乏しい。

「カンゾウ抽出物」は、第8版食品添加物公定書に記載され、その基原植物種は定義されているが、「カンゾウ油性抽出物」は公定書未記載であり、公的な規格、試験法がいまだ設定されていない。このような背景から、「カンゾウ油性抽出物」の今後の規格設定に向け、市場にすでに流通している「カンゾウ油性抽出物」の製品について、その成分組成を明らかにするとともに、その定義の設定および製品の品質や安全性確保の観点から基原植物種の確認が必要とされる。

本研究では、成分組成解析により基原のカンゾウ属植物種を推定するために、「カンゾウ油性抽出物」の流通製品8検体を用いて、3種のカンゾウ属植物種に含有される主成分7種^{1), 11), 14)} についてのLC/MSによる定量を行い、「カンゾウ抽出物」や生薬カンゾウのエタノール抽出物と成分組成を比較した。また「カンゾウ油性抽出物」、およびその基原植物種や近縁種の乾燥試料とカンゾウ由来製品からのエタノール抽出物の計31検体のLC/MS (SIR) 測定データ、NMR測定データを用い、多変量解析により添加物製品の基原種の確認および推定を試みたので報告する。

実験方法

1. 試 料

本研究で使用した試料の一覧、およびその形状と添付情報記載の基原植物種をTable 1に示す。既存添加物「カンゾウ油性抽出物」7製品 (S1~S7), 「カンゾウ油性抽出物」の製剤1製品 (S8), および添加物製品S1とS6の各基原植物のカンゾウ根 (S9およびS10) は、日本食品添加物協会を通じて供与されたものを使用した。5種のカンゾウ属植物体の根 (S11~S15) は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センター（筑波）より採取したものを使用した。カンゾウを原料とする製品として、生薬カンゾウ (*Glycyrrhizae Radix*) 6製品 (S16~S21, 国内生薬企業4社各1~2製品, このうち、中国産4製品, 原産地記載なし2製品) および日局収載生薬カンゾウ末 (*Glycyrrhizae Radix Pulverata*) (生薬カンゾウ末と表記) 1製品 (S22, 原産地記載なし), および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: S23~S34) 12製品を購入し、分析に供した。また、「カンゾウ油性抽出物」との比較のため、日本食品添加物協会を通じて供与された既存添加物「カンゾウ抽出物」2製品 (S35, S36) についても、同様に分析を行った。

2. 試 薬

カンゾウ中のフラボノイド類およびサポニン類^{1), 11), 14), 15)} (Fig. 1) の定量用標品として、次の7種の市販試薬を用いた。リクイリチン liquiritin (1) (和光純薬工業(株), Cat. No. 129-05341), グラブリジン glabridin (9) (和光純薬工業(株), Cat. No. 070-04821), リコカルコン A licochalcone A (8) (SIGMA-Aldrich Co., Cat. No. 68783), リクイリチゲニン liquiritigenin (4) (Chroma-

*1 厚生省告示第120号“既存添加物名簿”平成8年4月16日(1996)

*2 消費者庁次長通知“食品衛生法に基づく添加物の表示等について、別添1既存添加物名簿収載品目リスト”平成22年10月20日、消費表第377号(2010)

*3 第8版食品添加物公定書, 厚生労働省(2007)

*4 第十六改正日本薬局方, 厚生労働省(2011)

Table 1. Information about licorice oil extracts and the related *Glycyrrhiza* samples

Sample		<i>Glycyrrhiza</i> species* (of origin plant)	Form
No.	Type		
Licorice oil extract			
S1	Food additive	<i>G. glabra</i>	Lump of powder
S2	Food additive	<i>G. glabra</i>	Liquid
S3	Food additive	<i>G. glabra</i>	Powder
S4	Food additive	<i>G. glabra</i>	Powder
S5	Food additive	<i>G. glabra</i>	Powder
S6	Food additive	<i>G. inflata</i>	Powder
S7	Food additive	—	Liquid
S8	Food additive (preparation)	<i>G. glabra</i>	Liquid
Root of <i>Glycyrrhiza</i> plants			
S9	root, raw material of S1	<i>G. glabra</i>	Torn
S10	root, raw material of S6	<i>G. inflata</i>	Torn
Root of <i>Glycyrrhiza</i> plants cultivated in NIBIOHN**			
S11	root	<i>G. glabra</i>	Whole
S12	root	<i>G. glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i> Regel et Herder	Whole
S13	root	<i>G. uralensis</i>	Whole
S14	root	<i>G. echinata</i>	Whole
S15	root	<i>G. pallidiflora</i>	Whole
<i>Glycyrrhizae Radix</i>			
S16	Herbal medicine	<i>G. uralensis</i>	Chip
S17	Herbal medicine	<i>G. uralensis</i>	Chip
S18	Herbal medicine	<i>G. uralensis</i> / <i>G. glabra</i>	Chip
S19	Herbal medicine	<i>G. uralensis</i> / <i>G. glabra</i>	Chip
S20	Herbal medicine	—	Chip
S21	Herbal medicine	—	Chip
S22	Herbal medicine	—	Powder
Commercial <i>Glycyrrhiza</i> product			
S23	Herbal tea (root)	<i>G. glabra</i>	Chip
S24	Herbal tea (root)	<i>G. glabra</i>	Chip
S25	Herbal tea (root)	<i>G. glabra</i>	Chip
S26	Herbal tea (root)	<i>G. glabra</i>	Chip
S27	Herbal tea (root)	<i>G. uralensis</i>	Chip
S28	Cosmetic material (extract)	<i>G. uralensis</i>	Liquid
S29	Cosmetic material (root)	—	Chip
S30	Cosmetic material (extract)	—	Liquid
S31	Herb tea with licorice	—	Chip
S32	Herb tea with licorice	—	Chip
S33	Supplement	<i>G. glabra</i>	Powder in capsule
S34	Dentifrice	—	Paste
Licorice extract			
S35	Food additive	—	Powder
S36	Food additive	—	Powder

*: Except for samples S11–S15, the species mentioned in the incidental information of the samples.

** : National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition.

Dex. Co., Ltd., Cat. No. ASB-00012291-010), イソリクイリチゲニン isoliquiritigenin (5) (ChromaDex. Co., Ltd., Cat. No. ASB-00009265-005), グリチルリチン酸標準品 glycyrrhizic acid (13) (和光純薬工業(株), Cat. No. 071-02271) およびグリチルレチン酸 glycyrrhezinic acid (glycyrrhetic acid) (14) (和光純薬工業(株), Cat. No. 072-02181). また他の含有成分はいずれも市販標品がないか、もしくは入手困難であったため、深井らが各種カンゾウ属植物より単離した glabrol (10) (Fig. 1), および田

村らが各種カンゾウ属植物より単離した isoliquiritin (3), isoliquiritin apioside (2), glycycomarin (6) (Fig. 1) を、各化合物の定性用標品として用いた.

NMR測定用重溶媒には重メタノール (methanol- d_4) (Isotec社, Cat. No. 151947) を用い、内部標準物質として 1,4-BTMSB- d_4 標準物質 (1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_4) (和光純薬工業(株), Cat. No. 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.

ン範囲, m/z 100~1,000; SIR (single ion recording) 測定 (Table 2).

4.2 LC/MSによる定量

LC/MSによる定量対象試料として、「カンゾウ油性抽出物」7製品および製剤1製品 (S1~S8), および比較対象として生薬カンゾウ1製品 (S16) からのエタノール抽出物および「カンゾウ抽出物」(S35およびS36) の計11試料を用いた. 定量対象化合物として, *G. glabra*, *G. inflata* および *G. uralensis* いずれかで主な成分として含有され, かつ市販試薬が入手可能であった7種 (liquiritin (1), liquiritigenin (4), isoliquiritigenin (5), licochalcone A (8), glabridin (9), glycyrrhizic acid (13) および glycyrrhezinic acid (14)) を定量した. 検量線の作成には, 定量対象5種 (1, 4, 5, 8, 9) の混合溶液, および glycyrrhizic acid (13) と glycyrrhezinic acid (14) の定量対象2種 (13, 14) の混合溶液をそれぞれ調製 ($n=3$) して用いた. すなわち, メタノールを用い, 各標品につき 0.01~1 $\mu\text{g/mL}$ の範囲に相当する5濃度の混合液を調製した. 試料中の成分の定量には, LC/MS測定でのピーク面積値を用いた. 4.1で調製した各試料溶液を, 定量対象成分が各標品の混合液から作成した絶対検量線の範囲に入るよう, 適宜メタノールで希釈 (1~80倍) した溶液を用いた. 各成分のSIR検出条件をTable 2に示した. 試料調製 $n=3$ の測定結果を平均して定量値とした.

4.3 LC/MS測定結果を用いた主成分分析

「カンゾウ油性抽出物」4製品および製剤1製品 (S1, S2, S6~S8), カンゾウ属植物体の根 (S11~S15), カンゾウ根およびカンゾウ由来製品 (S9, S10, S16~S34) の計31試料について, LC/MS測定結果を用いた主成分分析 (principal component analysis) を行った. 主成分分析用のLC/MS測定には, 各試料のベースピークのイオン強度が同程度となるように, 4.1で調製した各試料溶液を

適宜希釈した溶液 ($n=1$) を用いた. 4.1の条件でLC/MS分析 (SIR測定, ESI neg.) を行い, 各種試料より検出された計14種の主要ピーク (Table 2) のピーク面積値 (3回測定の平均値) を説明変数として, 主成分分析 (principal component analysis) を行った. 多変量解析ソフトにはJMP 7 (SAS Institute Japan Ltd.) を用いた. 本研究では成分組成の差の検出を目的としたので, 試料の濃度や成分ごとのイオン化率の差の影響を除く目的で, まず各試料について最大ピークの面積値が100となるよう試料ごとに値を比率換算して主成分分析に用いた.

5. NMR測定

5.1 NMR測定用試料溶液の調製

4.3のLC/MS測定で対象とした計31試料を用い, NMR測定用試料溶液の調製を行った. まず, 固体試料 (S1, S6) 以外の試料につき, 次の方法で固形分を得た. 85%エタノール溶液の試料 (S2およびS7) はエバポレーターで減圧乾固した. 76%プロピレングリコール溶液の試料 (S8) は, 同量のベンゼンを用いて液-液分配を行い, ベンゼン層をエバポレーターで減圧乾固した. ブチレングリコール溶液の試料 (S28およびS30) は凍結乾燥した. カンゾウ根およびカンゾウ由来製品 (S9~S27, S29, S31~S34) は, 1gをエタノール (99.5%) 6 mLで, 常温 16 hr抽出し, 遠心分離 (10,000 rpm, 2分) 後の上澄をエバポレーターで減圧乾固した.

固体試料 (S1, S6) および他の各試料の固形分は, 16 h凍結乾燥した後精秤し, 各試料につき固形分含量が 20 mg/mLとなるように, あらかじめ調製した0.2 mg/mL 1,4-BTMSB- d_4 /メタノール- d_4 溶液を加えて溶解し, 試料溶液とした. これらの試料溶液各0.6 mLをそれぞれNMR試験管に封入し測定に供した.

5.2 NMR測定条件

5.1で調製した試料溶液のNMR測定には, 定量NMR

Table 2. LC/MS SIR conditions for compounds 1-14

Peak No.*	Compound	Molecular formula	Retention time (min)	MW	LC/MS SIR (ESI neg.) conditions	
					Detection (m/z)	Cone voltage (V)
I	Liquiritin (1)	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	4.5	418	417.2	40
II	Isoliquiritin apioside (2)	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	6.5	550	549.2	50
III	Isoliquiritin (3)	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	8.1	418	417.2	40
IV	Liquiritigenin (4)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	12.4	256	255.1	40
V	Isoliquiritigenin (5)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	20.8	256	255.1	40
VI	Glycoumarin (6)	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	27.6	368	367.1	50
VII	—**	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	31.5	382	381.2	50
VIII	Licochalcone A (8)	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	32.4	338	337.2	50
IX	Glabridin (9)	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	34.6	324	323.2	40
X	Glabrol (10)	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	39.4	392	391.2	40
XI	—**	C ₂₆ H ₃₂ O ₅	41.6	424	423.3	40
XII	—**	C ₂₇ H ₃₄ O ₅	52.0	438	437.2	50
	Glycyrrhizic acid (13)	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	26.0	822	821.5	60
	Glycyrrhezinic acid (14)	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	46.8	470	469.4	80

*: Peaks shown in Fig. 2.

** : Unidentified.

(qNMR) 用に最適化した以下の条件を用いた。スペクトル中心は5 ppm, 測定スペクトル幅は20 ppmとした。パルス角は90度に設定し, 取り込み時間4秒, デジタル分解能0.25 Hz, 遅延時間60秒, スピンオフ, MPF8による¹³Cデカップリング下, 室温条件で8回積算した。ケミカルシフト値は, 内部標準物質として添加した1,4-BTMSB-*d*₄のシグナルをδ0 ppmとした。なお, 固形分回収量の少なかったS11, S14, S15, S28, S30は, 積算回数を32回とした。

5.3 NMR測定結果を用いた主成分分析

「カンゾウ油性抽出物」4製品および製剤1製品 (S1, S2, S6~S8), カンゾウ属植物体の根 (S11~S15), カンゾウ根およびカンゾウ由来製品 (S9, S10, S16~S34) の計31試料について, NMR測定結果を用いた主成分分析 (principal component analysis) を行った。各試料のNMR測定結果のδ4.72~9.50 ppmの範囲について0.04 ppmごとにバケット積分した値を変数として使用し, 多変量解析ソフト Alice 2 for metabolome (日本電子(株)製) により主成分分析を行った。

結果および考察

1. 「カンゾウ油性抽出物」およびカンゾウ由来試料のLC分析

LC/MSにより, 「カンゾウ油性抽出物」の製品および各種カンゾウ由来試料 (Table 1) の分析を行った。Fig. 2(A)a, bおよびdには「カンゾウ油性抽出物」製品の, Fig. 2(A)c, eおよびfにはカンゾウ由来試料の, Fig. 2(B)g~kにはカンゾウ属植物体の根からのエタノール抽出物の検出波長UV 200~500 nmにおけるクロマトグラムを示す。また, これらの試料で顕著に認められたピークを保持時間の速い順にpeak I~XIIとし, Fig. 3に各UVスペクトルを示す。Peak I, IV, V, VIIIおよびIXは, 市販試薬とのLC/MS分析における保持時間, UVスペクトルおよびMSスペクトルとの一致から, それぞれliquiritin (1), liquiritigenin (4), isoliquiritigenin (5), licochalcone A (8) およびglabridin (9) (Fig. 1) と同定した。また, 同様にしてpeak II, III, VIおよびXは, カンゾウからの単離標品との比較からそれぞれisoliquiritin apioside (2), isoliquiritin (3), glycycomarin (6) およびglabrol (10) (Fig. 1) と同定された。Peak VII, XIお

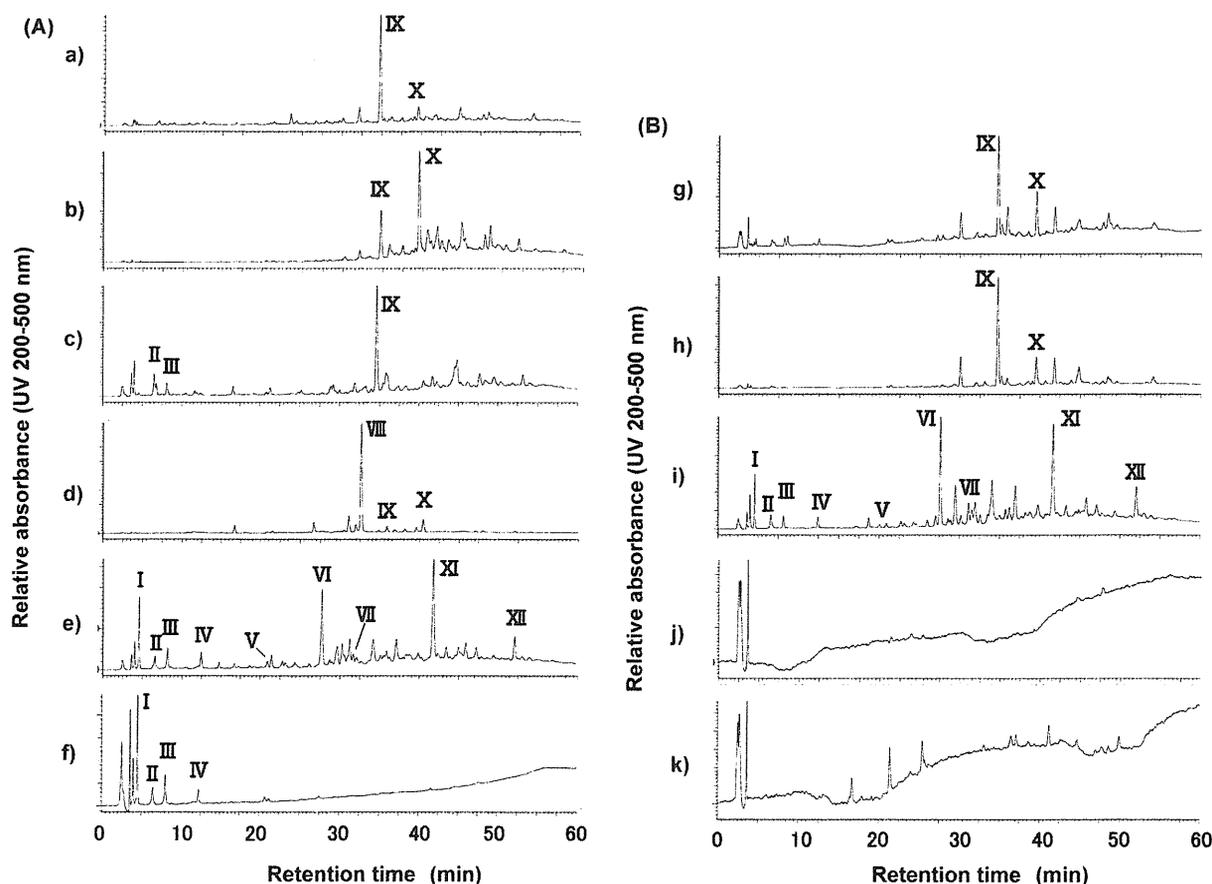


Fig. 2. LC/UV chromatograms of *Glycyrrhiza* samples

(A): a), b) and d): Licorice oil extracts used as food additives, S1 (origin: *G. glabra*), S2 (origin: *G. glabra*) and S6 (origin: *G. inflata*), respectively; c): Ethanol extracts from herbal tea, S25 (origin: *G. glabra*); e): Ethanol extract from herbal medicine *Glycyrrhizae Radix*, S16 (*G. uralensis*); f): Ethanol extract from cosmetic material, S28 (origin: *G. uralensis*)
 (B): g), h), i), j) and k): Ethanol extracts from the roots of *Glycyrrhiza* species, S11 (*G. glabra*), S12 (*G. glabra* var. *glandulifera* Regel et Herder), S13 (*G. uralensis*), S14 (*G. echinata*) and S15 (*G. pallidiflora*), respectively

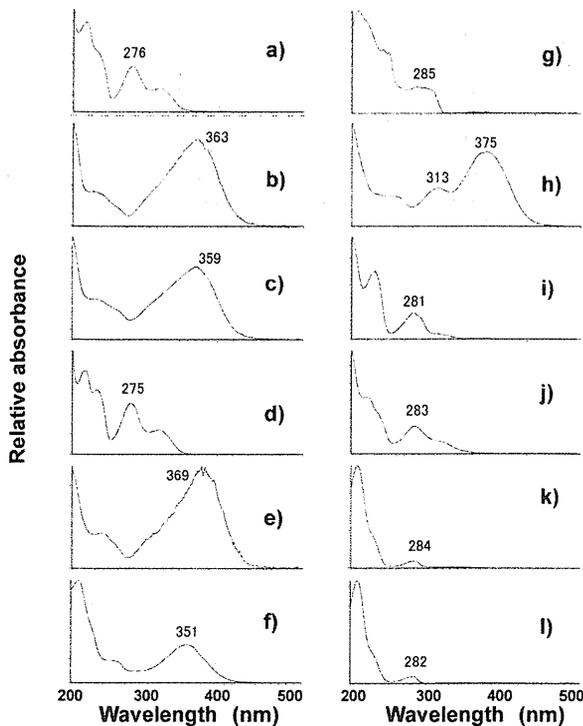


Fig. 3. UV spectra of the twelve peaks I–XII detected in the *Glycyrrhiza* samples

a), b), c), d), e), f), g), k) and l): Peaks I, II, III, IV, V, VI, VII, XI and XII, respectively, shown in Fig. 2(e); h): Peak VIII shown in Fig. 2(d); i) and j): Peaks IX and X, respectively, shown in Fig. 2(b)

およびXIIは各MSスペクトル値より、それぞれ分子量382, 424および438の化合物と推測された。

既存添加物の「カンゾウ油性抽出物」7製品および製剤1製品 (S1~S8) の内, S6 (Fig. 2(A)d) 以外の試料では、いずれも主にpeak IX (glabridin (9)) およびpeak X (glabrol (10)) が認められ、2成分の比は試料により異なるもののクロマトグラムの特徴は類似した (S1, Fig. 2(A)aおよびS2, Fig. 2(A)b)。また、これらはS1の基原植物の根 (S9) や*G. glabra*および*G. glabra* var. *glandulifera* Regel et Herderの根 (S11およびS12) からのエタノール抽出物のクロマトグラム (Fig. 2(B)gおよびh) の特徴と同じであり、添加物試料S1~S5およびS8は基原植物種の情報通り*G. glabra*由来であると確認された。また、基原植物種の情報がなかったS7も*G. glabra*由来であると推定された。一方、*G. inflata*由来と記載のある「カンゾウ油性抽出物」製品S6 (Fig. 2(A)d) では、peak VIII (licochalcone A (8)) が顕著に認められ、この試料の基原植物*G. inflata*の根からのエタノール抽出物 (S10) の結果と類似した。

「カンゾウ油性抽出物」の基原植物種として、既存添加物名簿取載品目リスト*²の基原・製法・本質には、*G. glabra*および*G. inflata*以外に*G. uralensis*も記載されている。そのため、*G. uralensis*植物体の根 (S13) や*G. uralensis*を基原種とする製品の多い生薬カンゾウ (S16

~S21) および生薬カンゾウ末 (S22) からのエタノール抽出物の成分組成を調べた。その結果、peak I~VII, XI およびXIIが検出され、特にpeak I (liquiritin (1)), peak VI (glycycomarin (6)) およびpeak XIが顕著であった (S13, Fig. 2(B)iおよびS16, Fig. 2(A)e)。しかし、「カンゾウ油性抽出物」の各種試料 (S1~S8) では、これら*G. uralensis*由来試料に特徴的なクロマトグラムとはいずれも異なったため、*G. uralensis*を基原種としていないことが確認できた。

G. glabra, *G. inflata*および*G. uralensis*でそれぞれ顕著な成分として、glabridin (9), licochalcone A (8), およびglycycomarin (6) が報告されており^{1), 14)}, 上記の結果はこれらの報告と一致した。また、*G. echinata*植物体の根および*G. pallidiflora*植物体の根からの各エタノール抽出物 (S14, Fig. 2(B)jおよびS15, Fig. 2(B)k) では、*G. glabra*, *G. inflata*および*G. uralensis*で特徴的なピークは認められず、判別可能であった。

さらにカンゾウ基原種による製品の成分組成の違いを確認するため、他の市販カンゾウ由来製品 (S23~S34) についても調べた。その結果、S25 (Fig. 2(A)c) の様に*G. glabra*の成分組成の傾向を示す試料 (S23, S24およびS33) と、S28 (Fig. 2(A)f) のように*G. uralensis*の成分組成の傾向を示す試料 (S26, S27, S29~S32) が認められた。これらのうち、基原種が記載されている製品の多くで成分組成の特徴が一致したが、S26のみは記載されている*G. glabra*ではなく*G. uralensis*の成分組成の特徴を示した (データは示していない)。また、医薬部外品歯磨剤 (S34) では、抽出された成分の濃度が極めて低く、判別ができなかった。

2. LC/MSによる定量

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、標品の入手が可能であった7種の成分 (Table 3) を選択し、LC/MSにより、「カンゾウ油性抽出物」の製品および製剤計8製品 (S1~S8), 比較対象として「カンゾウ抽出物」 (S35およびS36) および生薬カンゾウ (S16) のエタノール抽出物を用いて、各含有成分の定量を行った。SIR (ESI pos., neg.) で比較を行い検出感度が良好であったSIR (ESI neg.) での定量値を結果とした (Table 3)。定量に用いた絶対検量線の相関係数 (R^2) はいずれも0.995以上と良好な直線性が得られた。Liquiritin (1), liquiritigenin (4), isoliquiritigenin (5), licochalcone A (8), glabridin (9), glycyrrhizic acid (13) およびglycyrrhezinic acid (14) の試料での定量下限値 (%) は、それぞれ0.006, 0.056, 0.048, 0.018, 0.046, 0.077, および0.029%であった。各試料の定量の結果 (Table 3), *G. inflata*由来と記載のある添加物 (S6) では、licochalcone A (8) の含量が19.7%と高かった。S6以外の添加物製品では、いずれもglabridin (9) 含量が高かったが、その含有量は0.79~28.3%と、製品により差異が認められた。また、比較に用

Table 3. Quantification of the major seven compounds detected in the samples using LC-MS (SIR, ESI neg.)

Sample		Liquiritin (1)	Liquiritigenin (4)	Isoliquiritigenin (5)	Licochalcone A (8)	Glabridin (9)	Glycyrrhizic acid (13)	Glycyrrhezinic acid (14)
Licorice oil extract (Food additive)	S1	0.06	0.21	0.08	0.02	10.1	0.19	0.22
	S2	ND	ND	ND	ND	0.79	ND	0.12
	S3	0.01	0.08	0.15	0.08	28.3	0.02	0.08
	S4	0.07	0.23	0.11	0.03	11.6	0.16	0.29
	S5	ND	ND	ND	0.00	2.65	ND	0.55
	S6	0.12	0.25	0.13	19.7	0.53	0.05	0.49
	S7	ND	0.01	0.00	0.00	1.12	ND	0.01
	S8	0.01	0.01	0.01	0.00	0.83	0.02	0.02
Licorice extract (Food additive)	S35	0.25	0.09	0.06	0.03	0.01	42.6	0.24
	S36	0.26	0.14	0.10	0.03	0.02	6.64	0.06
Glycyrrhizae Radix* (Herbal medicine)	S16	0.12	0.02	0.01	0.00	ND	0.02	0.00

Each value is a mean of three trials.

ND: Not detected.

*: Calculated from the results of the ethanol extract of S16

いた「カンゾウ抽出物」とは異なり、「カンゾウ油性抽出物」ではglycyrrhizic acid (13)は0.2%未満とほとんど検出されず、明らかに異なる組成を示した。

3. LC/MS測定結果を用いた主成分分析

「カンゾウ油性抽出物」の製品および製剤と各種カンゾウ由来試料合計31種 (S1, S2, S6~S34) のLC/MS測定結果を用い、主成分分析を行った。主成分分析には、検出感度が良好な計14種の指標ピーク (Table 2) のSIR測定結果 (ESI neg.) を用いた。Fig. 4に第1主成分 (PC1) と第2主成分 (PC2) のスコアプロットを示した。PC1およびPC2の寄与率は、それぞれ51.9%および10.0%であった。主成分分析により、大きく4つのグループ、すなわち*G. glabra*由来 (●), *G. inflata*由来 (■), *G. uralensis*由来 (▲) およびそれ以外の基原植物由来で分布が異なった (Fig. 4)。 *G. glabra*由来と *G. inflata*由来の分布の差は明確ではないものの、PC2軸方向で値が異なる傾向を示した。既存添加物製品は、主に *G. glabra*由来と推定される位置に分布し、基原植物種の記載のなかったS7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 (S26) も認められ、実際の基原種は *G. uralensis*である可能性が考えられた。LC/MSプロファイル (Fig. 2(A) および (B)) は基原植物種により特徴的であり、これは指標ピークのSIR測定結果を用いた主成分分析においても反映され、基原種の分類を把握することができた。

4. NMR測定結果を用いた主成分分析

「カンゾウ油性抽出物」の製品および製剤と各種カンゾウ由来試料合計31種 (S1, S2, S6~S34) のNMR測定結果を用い、主成分分析を行った。Fig. 5に「カンゾウ油性抽出物」の製品 (S1およびS6) (Fig. 5a, d), およびカンゾウ属植物体の根 (S11~S15) からのエタノール抽出物 (Fig. 5b, c, e, f, g) 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0.04 ppmごとのバケット積分値を用いた。Fig. 6に第1主成分 (PC1) と第2主成分 (PC2) のスコアプロットを示した。PC1およびPC2の寄与率は、それぞれ36.0%および20.9%であった。主成分分析の結果 (Fig. 6)、大きく4つのグループ、すなわち *G. glabra*由来 (●), *G. inflata*由来 (■), *G. uralensis*由来 (▲) およびそれ以外の基原植物由来に分類可能と思われた。得られた結果は、LC/MSプロファイル (Fig. 2 (A) および (B)), およびLC/MS測定結果の主成分分析 (Fig. 4) による分類とよく一致し、指標成分を特定せず、NMR測定によるバケット積分値を変数として用いた主成分分析 (Fig. 6) により、容易に基原植物種の確認および推定が可能であった。これまで既報^{9), 11)}において、カンゾウ属植物体の根の50%メタノール水溶液または10%メタノール水溶液による抽出物のNMR測定結果を用いた多変量解析で基原植物種により分類されることが示されている。本研究では新たに、添加物製品等のカンゾウ由来の流通製品を試料に用い、カンゾウ属植物体の根のエタノール抽出物とともにNMR測定結果を用いた主成分分析を行い、本解析方法が添加物製品の基原植物種の推定に有用であることを示した。また本研究では既報^{9), 11)}と異なり、高磁場側の結果は用いず4.72~9.50 ppmの範囲のみの結果で解析を行ったが、カンゾウ属植物種の分類が可能であることが示された。PC1およびPC2のローディングプロットの結果 (図は示していない) から、PC1では5.08~5.12 ppm, 5.28~5.32 ppmおよび6.32~6.36 ppmの、PC2では5.04~5.12 ppmの影響が大きいことが示され、本研究で実施した解析において基原の分類に重要であることが示された。NMR測定結果を用いた主成分分析では、LC/MSでは指標としていない副成分も含めて多変量解析しているためか、LC/MS測定結果を用いた主成分分析結果 (Fig. 4)

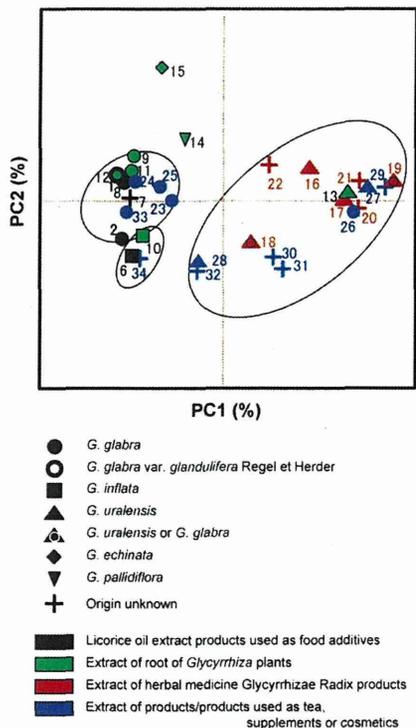


Fig. 4. Principal component analysis of *Glycyrrhiza* samples based on LC/MS (SIR, ESI neg.) peak data

PC1: contribution rate: 51.9%, PC2: contribution rate: 10.0%

The numbered labels indicate the corresponding sample numbers.

Each marker expresses the classification by *Glycyrrhiza* species of origin of samples or the species mentioned in the incidental information.

Each color expresses the classification by type of samples.

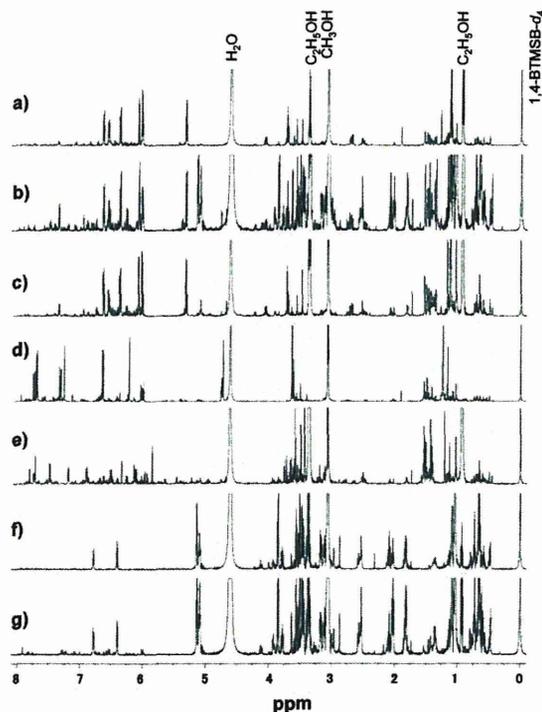


Fig. 5. ¹H-NMR spectra of licorice oil extracts used as food additives and ethanol extracts from roots of various *Glycyrrhiza* species

a) and d): Licorice oil extracts used as food additives, S1 (origin: *G. glabra*) and S6 (origin: *G. inflata*), respectively; b), c), e), f) and g): Ethanol extracts from roots of *Glycyrrhiza* species, S11 (*G. glabra*), S12 (*G. glabra* var. *glandulifera* Regel et Herder), S13 (*G. uralensis*), S14 (*G. echinata*) and S15 (*G. pallidiflora*), respectively.

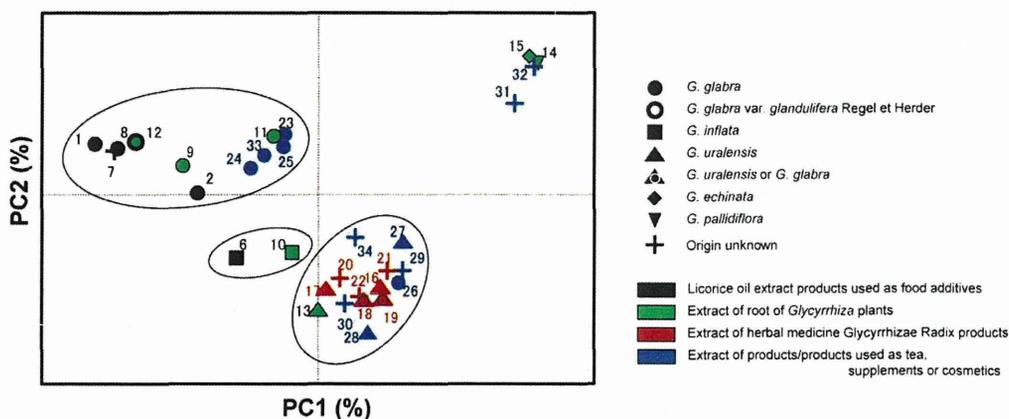


Fig. 6. Principal component analysis of *Glycyrrhiza* samples based on ¹H-NMR data

PC1: contribution rate: 36.0%, PC2: contribution rate: 20.9%

The numbered labels indicate the corresponding sample numbers.

Each marker expresses the classification by *Glycyrrhiza* species origin of samples or the species mentioned in the incidental information.

Each color expresses the classification by type of samples.

と比較し, *G. glabra*由来, *G. inflata*由来, *G. uralensis*由来の区分がより明確に検出できた。

結 論

「カンゾウ油性抽出物」の流通製品8検体を用い, *G. uralensis*, *G. inflata*または*G. glabra*に主に含有される成分7種につき, LC/MSによる定量を行ったところ, *G. uralensis*由来の比較対象である「カンゾウ抽出物」や生薬カンゾウのエタノール抽出物とは異なる組成を示した。本研究において, カンゾウ属植物体の根のエタノール抽出物や各種カンゾウ由来試料のLC/MS分析による比較から, 基原植物種によりそれぞれ特徴的な成分組成を示すことが確認された。また, LC/MS測定結果やNMR測定結果を用いた主成分分析においても基原植物種により分布が異なることが示された。本研究で分析した「カンゾウ油性抽出物」の製品8検体は, その成分組成と多変量解析による分類から, 1検体は*G. inflata*由来, それ以外は*G. glabra*由来であることが示され, 現在の「カンゾウ油性抽出物」の国内流通製品の多くは*G. glabra*由来であることが確認された。*G. uralensis*由来の「カンゾウ油性抽出物」の流通実態の有無については今回の結果のみでは判断できないが, さらに実態確認を行う際には, 本研究で確立した各種分析方法が有用と考えられる。「カンゾウ油性抽出物」の公的規格作成においては, 流通製品の基原種の範囲を把握したうえで検討する必要がある。なお, 各カンゾウ属植物のBGPlantsデータベース^{*5}における標準和名の記載を確認したところ(2015年5月現在), *G. glabra*の標準和名は既存添加物名簿収載品目リスト^{*2}に記載されているヨウカンゾウとは異なり, カンゾウであった。*G. inflata*については記載がなかった。そのため, 「カンゾウ油性抽出物」の公的規格作成時には, 基原植物種の和名表記についても留意が必要と考えられた。

さらに, 本研究で, 計31検体のLC/MS測定結果とNMR測定結果を用いた主成分分析を行い, これらの解析方法が, カンゾウ属植物体の基原の分類のみでなく, 既存添加物「カンゾウ油性抽出物」等のカンゾウ由来流通製品の基原植物種の推定にも有用であることが新たに示された。特に, NMR測定結果を用いた多変量解析は, 簡便に行うことができ, 指標成分を特定することなく主成分分析を実施しても基原種の分類が可能であったことから, 多成分の混在する既存添加物の基原植物種の推定に有用な方法であると示唆された。

謝 辞

本研究は, 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により実施したものである。カンゾウ油性抽出物および関連試料の収集にご協力いただいた日本食品添加

物協会に深謝いたします。

文 献

- Hatano, T., Fukuda, T., Liu, Y. Z., Noro, T., Okuda, T. Phenolic constituents of Licorice. IV. Correlation of phenolic constituents and Licorice specimens from various sources, and inhibitory effects of Licorice Extracts on xanthine oxidase and monoamine oxidase. *Yakugaku Zasshi*, **111**, 311–321 (1991).
- Yoneda, K., Yamagata, E., Teruya, M. Studies on resources of crude drugs (VI) Comparison of the constituents of *Glycyrrhiza Radix* (Licorice) from various countries. II. *Shoyakugaku Zasshi*, **45**, 220–226 (1991).
- Shibano, M., Matsumoto, Y., Kusano, G., Shibata, T. Researches of *Glycyrrhiza* species grown at medicinal plant gardens in Japan and basic studies for selection of pharmaceutically fine races. I. Comparative studies by HPLC patterns and constituents of areal parts. *Natural Medicines*, **50**, 273–283 (1996).
- Kitagawa, I., Chen, W. Z., Taniyama, T., Harada, E., Hori, K., Kobayashi, M., Ren, J. Quantitative determination of constituents in various Licorice roots by means of high performance liquid chromatography. *Yakugaku Zasshi*, **118**, 519–528 (1998).
- Kuwajima, H., Taneda, Y., Chen W. Z., Kawanishi, T., Hori, K., Taniyama, T., Kobayashi, M., Ren, J., Kitagawa, I. Variation of chemical constituents in processed Licorice roots: Quantitative determination of saponin and flavonoid constituents in bark removed and roasted Licorice roots. *Yakugaku Zasshi*, **119**, 945–955 (1999).
- Kusano, G., Shibano, M., Watanabe, H., Ozaki, K. Pharmaceutical botanical studies on some *Glycyrrhiza* species. *Yakugaku Zasshi*, **123**, 619–631 (2003).
- Tamura, T., Takahashi, S., Terasaki, S., Tanaka, A., Nagai, H., Hayashi, H., Fujii, I., Yokota, Y. Study on a simple method to presume the origin of *Glycyrrhizae Radix* using the JP determination method. *Annual Report of Toyama Institute of Health*, **36**, 46–53 (2009).
- Tanaka, K., Ina, A., Hayashi, K., Komatsu, K. Comparison of chemical constituents in *Glycyrrhiza uralensis* from various sources using a multivariate statistical approach. *J. Trad. Med.*, **27**, 210–216 (2010).
- Yang, S. O., Hyun, S. H., Kim, S. H., Kim, H. S., Lee, J., Whang, W. K., Lee, M. W., Choi, H. K. Differentiation of roots of *Glycyrrhiza* species by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **31**, 825–828 (2010).
- Montoro, P., Maldini, M., Russo, M., Postorino, S., Piacente, S., Pizza, C. Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**, 535–544 (2011).
- Farag, M. A., Porzel, A., Wessjohann, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques. *Phytochemistry*, **76**, 60–72

*5 BGPlants: http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html

- (2012).
- 12) Tao, W., Duan, J., Zhao, R., Li, X., Yan, H., Li, J., Guo, S., Yang, N., Tang, Y. Comparison of three officinal Chinese pharmacopoeia species of *Glycyrrhiza* based on separation and quantification of triterpene saponins and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, **141**, 1681–1689 (2013).
- 13) Qiao, X., Ye, M., Xiang, C., Wang, Q., Liu, C. F., Miao, W. J., Guo, D. A. Analytical strategy to reveal the *in vivo* process of multi-component herbal medicine: A pharmacokinetic study of licorice using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1258**, 84–93 (2012).
- 14) Kondo, K., Shiba, M., Nakamura, R., Morota, T., Shoyama, Y. Constituent properties of Licorices derived from *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, or *G. inflata* identified by genetic information. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1271–1277 (2007).
- 15) Ito, Y., Ishizuki, K., Sugimoto, N., Tada, A., Akiyama, T., Sato, K., Akiyama, H., Goda, Y. Confirmation of the configuration of two glucuronic acid units in glycyrrhizic acid. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **22**, 32–37 (2015).

味認識装置による既存添加物苦味料及び関連苦味化合物の品質評価

(2014年10月10日受付)

(2014年12月15日受理)

多田敦子^{a)}、杉本直樹^{a)}、小林義和^{b)}、濱田ひかり^{b)}、石附京子^{a)}、
秋山卓美^{a)}、伊藤裕才^{a,e)}、川原信夫^{c)}、山崎 壮^{d)}、穂山 浩^{a)}

- a) 国立医薬品食品衛生研究所
b) 株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー
c) 独立行政法人 医薬基盤研究所
d) 実践女子大学
e) 現所属：共立女子大学

Qualitative evaluation of natural bittering food additives and related bittering compounds using a taste sensing system

(Received October 10, 2014)

(Accepted December 15, 2014)

Atsuko Tada^{a)}、Naoki Sugimoto^{a)}、Yoshikazu Kobayashi^{b)}、Hikari Hamada^{b)}、Kyoko Ishizuki^{a)}、
Takumi Akiyama^{a)}、Yusai Ito^{a,e)}、Nobuo Kawahara^{c)}、Takeshi Yamazaki^{d)}、Hiroshi Akiyama^{a)}

- a) National Institute of Health Sciences
b) Intelligent Sensor Technology, Inc.
c) National Institute of Biomedical Innovation
d) Jissen Women's University
e) Current affiliation: Kyoritsu Women's University

Abstract

The applicability of a taste sensing system was assessed by evaluating the taste qualities of 9 natural bittering food additives, 22 bittering reagents and 3 astringent reagents. The intensities of 10 taste factors for each sample were calculated from data collected from 6 artificial lipid membranes attached to the taste sensing system. The intensity of the taste factor with the highest absolute value for each sample was assigned a value of 100, and the intensities of the other taste factors for the same sample were provided as relative percentage values. The relative percentage values were plotted on radar charts for each sample, and the taste qualities of the samples were compared based on the radar chart patterns. The taste quality of samples was roughly classified into five types based on their taste quality patterns. Taste quality type appears to be characterized by the chemical structure of the bittering substance, since samples containing similar bittering constituents showed similar taste quality patterns. In addition, principal component analysis (a multivariate analysis) using the relative percentage values of 10 taste factors for each sample clearly classified the five types of taste qualities of bittering substances.

This study demonstrated the applicability of the taste sensing system to evaluate the taste qualities of natural bittering food additives and bittering reagents. The results suggest that the chemical structure types of unidentified bittering constituents in bittering substances can be estimated using the taste sensing system to evaluate taste qualities. These results should also be useful to evaluate the taste qualities of other commercially available bittering products as well as food additives.

Keywords : 食品添加物、苦味料、味認識装置

food additive, bittering substance, taste sensing system

I 緒言

古くから食品添加物として用いられてきた天然物は、食品衛生法が改正されて1995年より既存添加物名簿¹⁾に記載さ

れたもののみが食品添加物として使用できるようになった。既存添加物名簿に記載された天然由来の食品添加物(既存添加物)には苦味料として用いられるものがあるが、多くは植物の水またはアルコールによる抽出物であり、いずれも多

連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 多田敦子

Corresponding author: Atsuko Tada, Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

成分の混合物である。そのため、含有成分の組成や主要苦味成分の正確な把握が困難であることから、苦味料として用いられる既存添加物は、単一の苦味成分で構成される「ナリンジン」を除き、我が国の食品添加物の成分規格が示された食品添加物公定書²⁾に記載されておらず、一部の品目に業界が定める自主規格³⁾が設定されているのみとなっている。

天然由来の苦味料の適切な品質を確保するためには、公的な成分規格を設定することが重要である。成分規格を作成するためには、苦味料としての有効性の客観的な評価、さらには苦味成分の同定が必須であると考えられる。しかし、苦味の確認はヒトの官能試験により行われるため、個人差により客観性及び再現性に欠けることだけでなく、ヒトによる評価の安全性が問題となる。この問題が天然由来の苦味料の公的な成分規格作成の際の大きな障壁となってきた。このため、苦味の確認を客観的に評価可能な品質評価手法の導入が望まれていた。近年、味認識装置を用いた苦味物質を解析した研究が報告されている⁴⁻⁹⁾。しかし、味認識装置により種々の食品添加物苦味料の味質を解析した結果は報告

されていない。

本研究では、苦味の評価手法として、近年様々な分野で利用されている味認識装置を用い、既存添加物の苦味料及び関連苦味化合物の味質の解析の可能性について検討した。各種苦味化合物の味質を調べるため、味認識装置による測定で得られる10種の味要素項目値を用い、各試料の味質のパターンをレーダーグラフに示し、相互に比較して分類した。また、得られた値を用いて主成分分析(多変量解析)を行い、味質の分類・評価方法を検討した。

II 研究方法

1. 試料・試薬

既存添加物苦味料9品目各1製品(平成23年の既存添加物名簿からの消除以前に入手したヒメマツタケ抽出物及びヒキオコシ抽出物を含む。)は、日本食品添加物協会を通じて入手した以下のものを用いた(Table 1)。

Table 1. Test samples

	No.	Samples	Structural classes	Tested concentrations
Bittering food additives	1	Jamaica quassia extract		0.001 - 1.6%
	2	Mannentake extract		0.003 - 0.1%
	3	Himematsutake extract		0.003 - 0.1%
	4	Iso- α -bitter acid		0.0003 - 0.3%
	5	Caffeine (extract)		0.01 - 10 mM
	6	Absinth extract		0.003 - 0.1%
	7	Isodonis extract		0.003 - 0.1%
	8	Naringin (a)		0.006 - 0.06%
	9	Naringin (b)		0.006 - 0.06%
Bittering reagents	10	Quinidine	Quinoline alkaloid	0.01 - 0.3 mM
	11	Quinidine hydrochloride monohydrate	Quinoline alkaloid	0.01 - 0.3 mM
	12	Quinidine sulfate dihydrate	Quinoline alkaloid	0.01 - 0.3 mM
	13	Quinine	Quinoline alkaloid	0.01 - 0.3 mM
	14	Quinine hydrochloride dihydrate	Quinoline alkaloid	0.003 - 1mM
	15	Cinchonine	Quinoline alkaloid	0.01 - 0.3 mM
	16	Cinchonine sulfate dihydrate	Quinoline alkaloid	0.01 - 0.3 mM
	17	Berberine chloride dihydrate	Isoquinoline alkaloid	0.01 - 0.3 mM
	18	Iso- α -acid	Phloroglucin derivative	0.003 - 3%
	19	Caffeine	Purine alkaloid	0.01 - 10 mM
	20	Theobromine	Purine alkaloid	0.01 - 10 mM
	21	Enmein	Diterpene	0.01 - 3 mM
	22	Quassin	Triterpene	0.01 - 3 mM
	23	Gentiopicroside	Monoterpene glycoside	0.01 - 3 mM
	24	Swertiamarin	Monoterpene glycoside	0.01 - 3 mM
	25	Nomilin	Triterpene	0.01 - 3 mM
	26	Limonin	Triterpene	0.01 - 3 mM
Astringent reagents	27	Naringin hydrate	Flavanone glycoside	0.01 - 3 mM
	28	Sodium benzoate	Benzene derivative	0.01 - 10 mM
	29	Andrographolide	Diterpene	0.01 - 3 mM
	30	5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine	Purine glycoside	0.01 - 10 mM
	31	N-Phenylthiourea	Benzene derivative	0.01 - 10 mM
	32	Ellagic acid dihydrate	Tannin	0.01 - 10 mM
	33	Gallic acid	Tannin	0.01 - 10 mM
	34	Tannic acid	Tannin	0.001 - 1.6%

ジャマイカカッシア抽出物 Jamaica quassia extract (1)、レイシ抽出物 Mannentake extract (2)、ヒメマツタケ抽出物 Himematsutake extract (3)、イソアルファー苦味酸 Iso- α -bitter acid (4)、カフェイン (抽出物) Caffeine(extract) (5)、ニガヨモギ抽出物 Absinth extract (6)、ヒキオコシ抽出物 Isodonis extract (7)、ナリンジン Naringin (製品 a (8) 及び製品 b (9))。

また、苦味物質 22 種 ((10) ~ (31)) 及び比較対象として渋味物質 3 種 ((32) ~ (34)) を入手して用いた (Table 1)。安息香酸ナトリウム (28) 及び没食子酸 (33) は、関東化学株式会社 (東京) より、クアシン (22) 及び *N*-フェニルチオ尿素 (31) は、ナカライテスク株式会社 (京都) より購入したものをを用いた。イソ α 酸 (18) は、Kalsec 社 (アメリカ) より購入したものをを用いた。エンメイン (21) は、小城製薬株式会社 (大阪) の製品を用いた。アンドログラフォリド (29) は、センシンレン (*Andrographis paniculata*) からの単離物を県立広島大学名誉教授黒柳正典先生より分与していただいたものをを用いた。その他の苦味物質及び渋味物質は、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入したものをを用いた。上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品を用いた。

2. 装置

味測定は、味認識装置 SA402B (株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー、厚木) を用いて行った。各味要素 (taste factor) を検出するための脂質膜センサは、AC0、C00、AE1、AN0、AAE 及び CT0 の 6 種類のセンサを用いた^{4,5)} (Table 2)。各センサは類似味には類似した応答パターンを示す「広域選択性」を有しているため、その応答パターンから味の推定が可能である。

3. 試料の調製

脂質膜センサによる味覚測定では、安定した膜電位を測定するために、試料に支持電解質の添加が必要とされている。そこで、無味試料に相当する基準液には 10 mM 塩化カリウムを用いた。また、既存添加物苦味料、苦味物質及び渋味物質は、10 mM 塩化カリウムを添加し、それぞれ Table 1 に示す濃度範囲で 4 ~ 7 点の濃度に調製した。ただし、苦味物質 21 ~ 26 及び 29 は、10 mM 塩化カリウムへの溶解が困難であったため、エタノール 30vol% を含む 10 mM 塩化カリウム溶液を用いて Table 1 に示す濃度範囲で 6 点の濃度に調製し、基準液としてエタノール 30vol% を含む 10 mM 塩化カリウム溶液を用いた。

ウム溶液を用いて Table 1 に示す濃度範囲で 6 点の濃度に調製し、基準液としてエタノール 30vol% を含む 10 mM 塩化カリウム溶液を用いた。

4. 測定方法

既報⁵⁻⁹⁾と同様に、味認識装置の 6 種のセンサ (AC0、C00、AE1、AN0、AAE 及び CT0) を用いて各試料溶液の味測定を行い、3 回繰り返し測定 of the average value よりウェーバーの法則に基づいてヒトが感じる味強度の違いを推定し^{4,5)}、得られた値を各味要素の味強度値とした。本研究で評価した味要素は、酸味 (Sourness) (T1)、酸性苦味 (Acidic bitterness) (T2)、渋味 (Astringency) (T3)、塩基性苦味後味 1 (Aftertaste from basic bitterness 1) (T4)、塩基性苦味後味 2 (Aftertaste from basic bitterness 2) (T5)、酸性苦味後味 (Aftertaste from acidic bitterness) (T6)、渋味後味 (Aftertaste from astringency) (T7)、旨味 (Umami) (T8)、塩味 (Saltiness) (T9) 及び旨味コク (Richness) (T10) の 10 項目とした (Table 2)。各試料の各味要素の味強度値は、味認識装置の応答が最も良好であった試験濃度での、「相対値 (relative value)」（基準液と試料溶液の測定値の差）と、いわゆる後味に相当すると考えられる「CPA (Change of membrane Potential caused by Adsorption) 値」（試料測定の前と後での基準液の測定値の変化）を用いて算出した^{4,5,7)}。さらに、各試料につき 6 種のセンサから得られる「相対値」及び「CPA 値」を、味強度の参照物質 (reference materials for taste intensity) (Table 2) の応答に基づく値と比較することで、各味要素についての味強度値を算出した。

さらに、試料相互の味質のパターンの比較を行い易くするため、各試料につき、味要素 10 項目の内絶対値が最も高かった値を 100 とし、他の味要素項目の値を相対的に変換して % 換算値 (percentage value) とし、レーダーグラフに示した。

5. 主成分分析

上記の 4. の項に従って算出した各試料の味要素 10 項目の % 換算値、合計 10 種の情報を説明変数として、主成分分析 (Principal Component (PC) Analysis) を行い、各試料の味質のパターンを比較した。多変量解析ソフトには JMP 7 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

Table 2. Taste sensors and taste factors

Taste sensors	Taste factors*		Reference materials for taste intensity
	from relative value	from CPA value	
AC0	Sourness (T1)	Aftertaste from basic bitterness 1 (T4)	2.7 mM tartaric acid
C00	Acidic bitterness (T2)	Aftertaste from acidic bitterness (T6)	0.01 vol% iso-alpha acid
AE1	Astringency (T3)	Aftertaste from astringency (T7)	0.05% tannic acid
AN0	—	Aftertaste from basic bitterness 2 (T5)	0.1 mM quinine hydrochloride
AAE	Umami (T8)	Richness (T10)	10 mM monosodium glutamate
CT0	Saltiness (T9)	—	270 mM potassium chloride

* : Intensity of taste factors are calculated⁴⁾ from the output data by the taste sensors using the taste sensing system.

CPA: Change of membrane Potential caused by Adsorption

III 結果及び考察

1. 既存添加物苦味料及び苦味物質の味質のパターン

味認識装置により測定した既存添加物苦味料、苦味物質及び渋味物質における各味要素 (T1 ~ T10) の味強度を Table 3 に示す。各試料の各味要素 (T1 ~ T10) の味強度値の算出には、Table 1 に示す各試験濃度範囲の内、味認識装置の応答が最も良好であった試験濃度での測定値を用いた。味強度値が 1 以上の場合、明確なセンサ応答が得られたと判断できる。苦味物質測定の結果、キノリン及びイソキノリンアルカロイド (10 ~ 17) は塩基性苦味後味 2 (T5) で 5 以上の値を示し、明確に塩基性苦味物質として検知できた。イソ α 酸 (18) は酸性苦味 (T2) 及び酸性苦味後味 (T6) で 8.58

及び 18.25 と高い値を示し、明確に酸性苦味物質として検知できた。テルペン及びその配糖体 (21 ~ 26) は、センサの応答強度が低いものが多かった。また、トリテルペンであるクアシン (22) のセンサ応答強度は低かったが、これを主成分の一つとして含有する食品添加物ジャマイカカシヤ抽出物 (1) では塩基性苦味後味 1 (T4) 及び塩基性苦味後味 2 (T5) で 3.24 及び 1.64 とセンサ応答強度が高く、味認識装置により明瞭に検知することができた。

さらに既存添加物苦味料、苦味物質及び渋味物質は、それらの味質のパターンから Fig. 1 に示すような主に I から V の 5 つのタイプに分類されることが明らかとなった。苦味料として使用されている添加物には、実際には苦味というより、酸味や渋味を強く感じるものもある。そのため今回の解析で

Table 3. Intensity of taste factors of samples measured by the taste-sensing system

No.	Samples	Taste factors										Taste type
		T1 Sourness	T2 Acidic bitterness	T3 Astringency	T4 Aftertaste from basic bitterness 1	T5 Aftertaste from basic bitterness 2	T6 Aftertaste from acidic bitterness	T7 Aftertaste from astringency	T8 Umami	T9 Saltiness	T10 Richness	
1	Jamaica quassia extract (0.03%)	0.93	0.26	0.08	<u>** 3.24</u>	1.64	0.31	0.06	0.52	0.15	0.06	I
2	Mannentake extract (0.03%)	3.14	0.62	0.44	0.37	<u>5.49</u>	1.17	0.01	-2.31	0.12	0.18	I
3	Himematsutake extract (0.1%)	8.54	-0.18	0.01	<u>8.92</u>	5.71	-0.20	-0.12	2.70	0.40	0.18	I
4	Iso- α -bitter acid (0.03%)	-1.68	8.26	<u>15.39</u>	-0.53	0.62	13.39	3.30	7.96	2.77	0.42	II
5	Caffeine (extract) (10 mM)	-0.23	-0.15	-0.05	-0.26	<u>-0.35</u>	-0.02	-0.02	-0.30	0.12	0.00	III
6	Absinth extract (0.1%)	0.28	0.32	0.05	0.31	-0.27	<u>0.55</u>	0.01	-0.01	0.08	0.03	IV
7	Isodonis extract (0.1%)	<u>1.76</u>	0.73	0.14	0.19	1.32	1.29	0.06	-0.98	0.09	0.11	IV
8	Naringin (a) (0.06%)	0.30	0.12	-0.11	-0.04	-0.46	0.66	-0.03	<u>1.45</u>	0.41	0.68	V
9	Naringin (b)* (0.06%)	0.18	-0.16	-0.12	-0.11	-0.49	0.47	-0.12	<u>1.23</u>	0.40	0.54	V
10	Quinidine (0.1 mM)	<u>11.90</u>	0.76	0.28	6.37	11.47	0.05	0.00	2.84	0.09	0.20	I
11	Quinidine hydrochloride monohydrate (0.1 mM)	3.99	-2.00	-0.02	<u>5.92</u>	5.31	0.53	0.00	-0.94	0.03	0.21	I
12	Quinidine sulfate dihydrate (0.1 mM)	17.61	-2.63	-0.03	4.43	<u>19.24</u>	1.04	-0.01	-1.82	0.00	0.46	I
13	Quinine (0.1 mM)	<u>11.71</u>	0.38	0.20	7.27	11.16	-0.18	0.02	3.58	0.24	0.18	I
14	Quinine hydrochloride dihydrate (0.1 mM)	5.13	-0.30	0.01	0.72	<u>6.36</u>	0.34	0.00	0.69	0.00	0.11	I
15	Cinchonine (0.1 mM)	<u>11.40</u>	0.47	0.11	3.31	5.60	0.15	-0.02	2.39	0.27	0.16	I
16	Cinchonine sulfate dihydrate (0.1 mM)	<u>15.47</u>	-2.65	-0.04	2.55	12.34	1.01	-0.01	-0.82	0.07	0.44	I
17	Berberine chloride dihydrate (0.1 mM)	<u>15.96</u>	-4.80	-0.04	3.88	<u>16.05</u>	2.46	-0.01	-0.40	0.02	-0.01	I
18	Iso- α -acid (0.1%)	-5.05	8.58	13.69	-0.49	1.38	<u>18.25</u>	3.81	15.88	16.18	1.05	II
19	Caffeine (10 mM)	-0.31	-0.17	-0.06	-0.24	<u>-0.34</u>	0.06	-0.02	-0.27	0.14	0.01	III
20	Theobromine (3 mM)	-0.22	0.17	0.08	<u>-0.35</u>	-0.25	0.11	0.01	0.28	0.03	0.00	III
21	Enmein (0.1 mM)	0.14	-0.10	0.02	-0.01	-0.05	0.01	0.00	<u>-0.16</u>	0.01	0.03	IV
22	Quassin (1 mM)	<u>0.44</u>	0.28	-0.01	-0.01	-0.19	0.17	-0.01	-0.25	0.05	0.01	IV
23	Gentiopicroside (3 mM)	2.61	0.47	-0.01	-0.01	0.02	0.30	0.01	<u>-4.05</u>	-0.06	0.03	IV
24	Swertiamarin (0.1 mM)	0.04	-0.05	0.01	0.00	-0.05	<u>0.05</u>	-0.01	-0.01	-0.01	0.01	IV
25	Nomilin (0.1 mM)	0.13	-0.12	0.00	-0.15	-0.20	0.01	-0.01	<u>-0.28</u>	0.03	0.03	IV
26	Limonin (0.1 mM)	0.05	-0.10	0.01	-0.06	-0.11	-0.01	0.00	<u>-0.12</u>	-0.02	0.01	IV
27	Naringin hydrate (1 mM)	0.15	-0.35	-0.04	0.12	0.01	-0.62	-0.01	<u>2.00</u>	0.44	0.86	V
28	Sodium benzoate (3 mM)	-0.66	-0.36	1.17	0.36	2.06	-1.40	0.16	<u>20.60</u>	9.23	-0.60	V
29	Andrographolide* (3 mM)	-0.21	0.01	0.04	-0.17	-0.14	-0.16	0.01	<u>0.24</u>	0.16	0.07	V
30	5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine (10 mM)	-0.16	-0.12	-0.55	1.28	3.06	-0.24	-0.03	<u>8.80</u>	2.06	1.93	V
31	N-Phenylthiourea (10 mM)	1.03	1.44	3.19	2.14	0.32	0.81	1.45	-1.05	6.22	-1.76	
32	Ellagic acid dihydrate* (0.1 mM)	-0.04	-0.19	-0.01	-0.15	<u>0.19</u>	0.07	-0.02	-0.16	-0.02	0.03	I
33	Gallic acid (0.1 mM)	2.21	-0.78	0.15	-0.33	-0.25	-0.20	0.03	<u>-2.54</u>	-0.07	0.16	IV
34	Tannic acid (0.1%)	0.88	0.69	11.61	-1.19	-1.26	0.67	<u>12.60</u>	1.70	2.51	1.87	

* : The sample was measured as a suspension.

** : The underlined value is the highest absolute value for each sample.

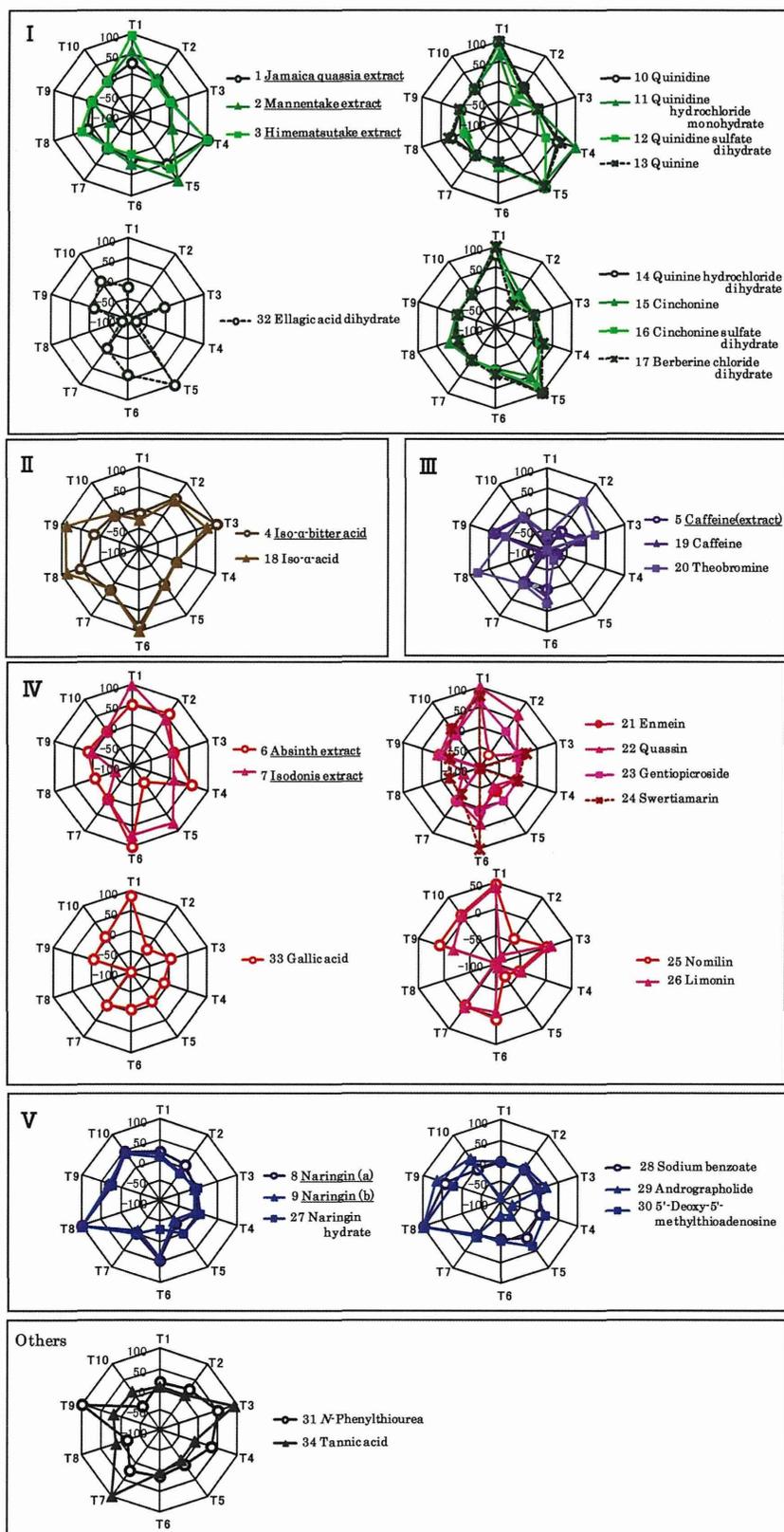


Fig. 1. Classification of bittering food additives, bittering reagents and astringent reagents based on their taste patterns

Percentage values of taste factors (T1 – T10) for each sample are shown on radar charts. The percentage values of taste factors were calculated from intensity values of taste factors shown in Table 3. Among the intensity values of various taste factors for each sample the value with the highest absolute was converted to 100 (%). Then, the values of the other taste factors for the same sample were relatively converted to percentage values.

Taste factors are sourness (T1), acidic bitterness (T2), astringency (T3), aftertaste from basic bitterness 1 (T4), aftertaste from basic bitterness 2 (T5), aftertaste from acidic bitterness (T6), aftertaste from astringency (T7), umami (T8), saltiness (T9) and richness (T10). The names of the underlined samples are those of food additive samples.

は、T1～T10の味要素項目が、それぞれ味の異なるベクトル(方向性)を示すものと捉え、%換算値を用いてレーダーグラフに示した際の全体の味質のパターンの違いに重点をおいて解析した。その結果、苦味化合物の化学構造の種類により、味質のパターンが異なることが明らかとなった。

タイプI (Fig. 1-I) は、酸味(T1)及び塩基性苦味後味2(T5)にプラスの値を示すタイプであり、キノリンアルカロイド(10～17)に特徴的である。既存添加物のジャマイカカシミア抽出物(1)、レイシ抽出物(2)、さらにヒメマツタケ抽出物(3)もこのタイプを示した。渋味物質のエラグ酸二水和物(32)は、基準液への溶解性が低く懸濁状での測定となった。酸味(T1)の味強度は低かったが塩基性苦味後味2(T5)の味強度が高く、タイプIの苦味物質の味質パターンに類似した。

タイプII (Fig. 1-II) は、酸性苦味(T2)、渋味(T3)、酸性苦味後味(T6)及び旨み(T8)にプラスの値を示すタイプであり、イソ α 酸(4、18)に特徴的である。既存添加物製品(4)と試薬(18)とで味質パターンがほぼ一致した。

タイプIII (Fig. 1-III) は、酸味(T1)及び塩基性苦味後味2(T5)でマイナスの値を示すタイプであり、プリンアルカロイド系苦味物質のカフェイン(19)やテオブロミン(20)に特徴的であった。

タイプIV (Fig. 1-IV) は、酸味(T1)にプラスの値を示し、さらに、酸性苦味後味(T6)でプラスの傾向、旨み(T8)でマイナスの傾向を示すタイプである。テルペノイド系苦味物質(21～26)に特徴的であり、既存添加物ニガヨモギ抽出物(6)、さらにヒキオコシ抽出物(7)がこのタイプを示した。渋味物質の没食子酸(33)もこのタイプIVの苦味物質の味質パターンに類似した。

タイプV (Fig. 1-V) は、旨味(T8)にプラスの値を示すタイプであり、ナリンジン(8、9及び27)に特徴的なタイプで、既存添加物製品(8、9)と試薬(27)とで味質パターンがほぼ一致した。また、他のいくつかの苦味化合物(28～30)もこのタイプを示した。また、タイプI～Vと異なるパターンを示した物質(31、34)をその他(Others)(Fig. 1)として示した。

既存添加物ジャマイカカシミア抽出物(1)(Fig. 1-I)では、主苦味成分とされるクアシン(22)(Fig. 1-IV)とは異なるパターンを示したことから、クアシン以外にも、キノリンアルカロイド等が示すタイプIの苦味物質を含有する可能性が示唆された。また、既存添加物レイシ抽出物(2)やヒメマツタケ抽出物(3)(Fig. 1-I)の苦味成分については十分解明されていないが、今回の結果から、苦味成分としてタイプIのキノリンアルカロイド様の物質を含有することが示唆された。また、カフェイン等のプリンアルカロイド(19、20)及びテルペノイド系苦味化合物(21～26)のセンサ応答は弱かったものの(Table 3)、味質のパターンは他の苦味物質とは異なり(Fig. 1-III、IV)、それぞれの味質の特徴を見出すことができた。食品添加物製品のニガヨモギ抽出物(6)及びヒキオコシ抽出物(7)は、それぞれアブシンチン等のセスキテルペン及びエンメイン等のジテルペノイドを主苦味成分とするとされており¹⁾、本研究においてもテルペノイド系苦味物質のタイプIVの味質パターン(Fig. 1-IV)に分類され、結果が合致した。以

上、各試料につき、各味要素の味強度値を用いて%換算値を算出し、味質のパターンを見ることで、それに含まれる苦味物質のタイプを推測できることが示され、本解析方法が苦味物質の評価法として有用であることが明らかとなった。

2. 主成分分析による既存添加物苦味料及び苦味物質の味質パターンの解析

味認識装置により測定した既存添加物苦味料、苦味物質及び渋味物質の合計34種についての各味要素10項目(T1～T10)の%換算値を説明変数に用いて主成分分析を行った。その結果得られた第1主成分(PC1)と第3主成分(PC3)のスコアプロットをFig. 2に示す。PC1、PC2及びPC3の寄与率は、それぞれ28%、24%及び14%であった。解析の結果、主成分分析のスコアプロット(Fig. 2)においても、Fig. 1で認められた5種の味質タイプ、すなわち、タイプI(キノリンアルカロイド系苦味)、タイプII(イソ α 酸系苦味)、タイプIII(プリンアルカロイド系苦味)、タイプIV(テルペノイド系苦味)及びタイプV(ナリンジン系苦味)ごとに分布が認められた。レーダーグラフ(Fig. 1)で確認された各種既存添加物苦味料、苦味物質及び渋味物質の味質パターンの分類が、主成分分析での解析(Fig. 2)により、容易に同一の図の中で捉えられることが明らかとなった。以上の結果から、苦味成分が未知の物質であっても、各苦味パターンの典型的な苦味物質の味測定の結果と共に主成分分析を行うことで、含有苦味成分のタイプを推測できるものと示唆され、苦味物質の評価法として有用であることが示された。

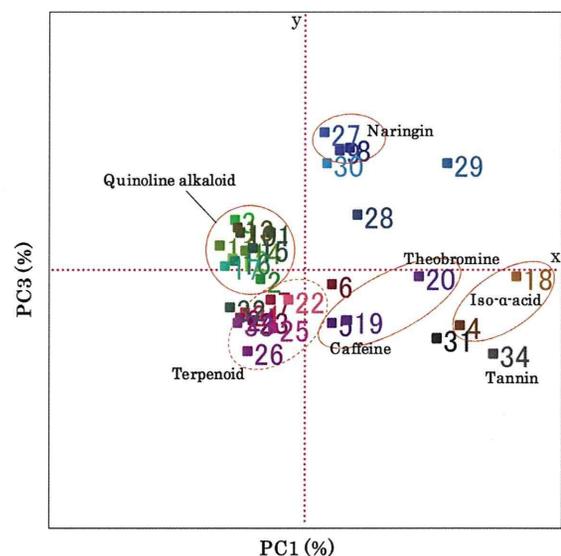


Fig. 2. Principal component (PC) analysis of percentage values of taste factors for bittering food additives, bittering reagents and astringent reagents

The numbered labels indicate the corresponding sample numbers.

PC1: contribution rate: 28%, PC2: contribution rate: 24%, PC3: contribution rate: 14%.

IV まとめ

天然由来の既存添加物苦味料の苦味の評価法を検討するため、各種既存添加物苦味料、苦味物質及び渋味物質を用い、これらの味質解析への味認識装置の適用性について調べた。各試料につき、味認識装置の6種の脂質膜センサへの応答値を用いて、10種の味要素項目それぞれの味強度値が算出された。さらに、試料相互の味質のパターンを比較しやすくするため、各試料につき、味要素10項目の内、絶対値が最も高かった値を100とし、他の味要素項目の値を相対的に変換して%換算値を算出した。試料ごとに%換算値をレーダーグラフに示して比較したところ、主に5つの味質パターンに分類され、苦味物質の化学構造の種類により特徴的な味質パターンを示すことが示唆された。多くの添加物苦味料の味質パターンは、含有苦味成分の味質パターンと類似した。さらに、各試料の%換算値を用いて、主成分分析(多変量解析)を行うことで、苦味物質の味質タイプの分類を明確かつ容易に評価できることが示された。

本研究により、既存添加物苦味料及び苦味物質の味質解析における味認識装置による測定の有用性が示された。含有苦味成分が未解明な苦味試料であっても、味認識装置を用いて味質のパターンを評価することで、苦味成分の構造タイプを推測できることが示唆された。また、本研究で得られた既存添加物苦味料製品及び苦味物質の味質パターンの評価結果は、食品添加物製品のみならず、市場に流通している他の各種苦味物質の品質管理を行う上でも有用と考えられる。

V 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金研究事業により実施したものである。味認識装置を用いた研究に関して御教示いただきました安食菜穂子先生に深謝いたします。また貴重な試料をご提供いただいた県立広島大学名誉教授黒柳正典先生(現 静岡県立大学客員教授)に深謝いたします。既存添加物苦味料の収集にご協力いただいた日本食品添加物協会に深謝いたします。

VI 参考文献

- 1) 厚生省告示第120号(1996)“既存添加物名簿”平成8年4月16日。
- 2) 厚生労働省“第8版食品添加物公定書”2007。
- 3) 日本食品添加物協会“第4版既存添加物自主規格”2008。
- 4) Kobayashi, Y., Habara, M., Ikezaki, H., Chen, R., Naito, Y., Toko, K.: Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores. *Sensors*, **10**, 3411-3443 (2010).
- 5) Anjiki, N., Kawahara, N., Goda, Y.: Evaluation of the taste of a Kampo formula by a taste-sensing system (1). *Natural Medicines*, **59**, 164-170 (2005).
- 6) Anjiki, N., Yoshino, C., Kawahara, N., Goda, Y.: Evaluation of the taste of a Kampo formula by a taste-sensing system (3): the Taste of Ryokeijutsukanto. *Shoyakugaku Zasshi (Japan. J. Pharmacog.)*, **61**, 6-13 (2007).
- 7) Anjiki, N., Kawahara, N., Goda, Y.: Studies on the taste profile analysis of Setsucha by a taste-sensing system. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, **14**, 121-127 (2007).
- 8) Anjiki, N., Hosoe, J., Fuchino, H., Kiuchi, F., Sekita, S., Ikezaki, H., Mikage, M., Kawahara, N., Goda, Y.: Evaluation of the taste of crude drug and Kampo formula by a taste-sensing system (4): taste of Processed Aconite Root. *J. Nat. Med.*, **65**, 293-300 (2011).
- 9) Anjiki, N., Hosoe, J., Fuchino, H., Ikezaki, H., Mikage, M., Kawahara, N., Goda, Y.: Quality evaluation of essential oils by a taste-sensing system. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **19**, 32-37 (2012).