

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の単離・同定

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

要旨 前年度までの研究において、*G. glabra*由来のカンゾウ油性抽出物製品では、主に抗酸化活性を示す8成分が確認された。この内、4成分については、市販標品や単離標品との比較やLC/MS/MSで同定できたが、残りの4成分については、分子量（MW）322、354、358および370の化合物と推定されたが、化合物の特定はできていなかった。本研究では、未同定の4成分の構造を明らかにする目的で、これら成分の単離・精製を行い、構造解析結果から4成分の化合物同定を行った。なお、MW 358およびMW 370の化合物は、これまでDPPHラジカル消去活性を有することは報告されていないが、本研究におけるこれらの単離画分ではDPPHラジカル消去活性を示した。

研究協力者

西崎雄三 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
受田浩之 高知大学
島村智子 高知大学

A. 研究目的

カンゾウ油性抽出物は、既存添加物名簿に記載されている酸化防止剤であるが、その成分規格は第8版食品添加物公定書には未だ記載されていない。公的規格を作成する上で、流通製品における主有効成分の把握が必要であり、これまでにDPPHラジカル消去活性測定法により、抗酸化活性画分の探索を行った。その結果、*G. glabra*由来のカンゾウ油性抽出物製品(KZ34)では、主に抗酸化活性を示す8成分が確認された。この内、1成分は市販標品との各種測定結果の比較により glabidin であると同定された。また、2成分は単離標品との各種測定結果の比較およびLC/MS/MSにより licochalcone B および hispaglabridin A と同定され、また他の1成分はLC/MS/MSにより kanzonol X と同定された。しかしながら、残り4成分については分子量(MW) 322、354、358 および 370 の化合物と推定され

たものの、化合物は特定できていなかった。

本研究では、*G. glabra*由来のカンゾウ油性抽出物流通製品において抗酸化活性寄与率の高かった8成分の内、未同定の4成分の構造を明らかにする目的で、これら成分の単離・精製を行い、構造解析結果から化合物の同定を行った。また、既に標品との比較やLC/MS/MSにより同定していた4成分についても単離・精製を行い、構造解析結果から化合物の確認を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料

日本食品添加物協会を通じて供与されたカンゾウ油性抽出物KZ34(*G. glabra*由来と記載されている製品、褐色塊)を使用した。

B-2. 試薬およびカラム樹脂

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)は、B-4のTLC-DPPHではWako社製の試薬を、B-14のDPPHラジカル消去活性測定ではSigma社製の試薬を使用した。また、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)はAldrich製の試薬を使用した。

NMR測定用重溶媒は、methanol-*d*₄、acetone-*d*₆、

chloroform-*d* を使用した (Isotec 社製) . 上記以外の試薬・溶媒はすべて市販一級品 , 市販特級品または HPLC 用を使用した .

ゲル濾過樹脂は , Sephadex LH-20 を使用した (GE Healthcare 社製) . ODS 樹脂は , YMC*GEL ODS-A (細孔径 12 nm 粒子径 150 μm , AA12SA5 を使用した (YMC 社製) .

B - 3 . 使用機器

高速液体クロマトグラフ/四重極型質量分析計 (LC/MS) は , alliance Waters 2695 (HPLC) , Waters 2996 (PDA) , Micromass Quattro Micro™ (MS) を使用した (Waters 社製) . 分取 HPLC は , CBM-20A (システムコントローラ) , LC-20AD (ポンプ , 2 台) , DGU-20A_{3R} (デガッサー) , SPD-M20 (PDA) , CTO-20AC (カラムオーブン) , FRC-10A (フラクションコレクター) , LC solution (ソフトウェア) を使用した (SHIMADZU 社製) . NMR は , オートサンプラー付 JNM-ECA600 を使用した (JEOL 社製) . NMR のケミカルシフト値は , 各重溶媒のピークを基準とした .

B - 4 . TLC-DPPH 法による活性画分のスクリーニング

TLC プレートは , UNIPLATES SILICA GEL GF 250 microns を使用した (ANALTECH 社製) . 展開溶媒には , butanol/ acetone/ 5% ammonia water/ water (11/3/3/3) を調製して用いた . DPPH 40 mg を ethanol 100 mL に溶解し , DPPH 溶液を調製した . 分画試料を TLC プレートで展開後 , DPPH 溶液を噴霧し , 分画試料中の成分との反応により DPPH の色が消失あるいは薄くなる画分を DPPH ラジカル消去活性画分と判断した .

B - 5 . LC/MS による活性画分のスクリーニング

HPLC カラムは , Inertsil ODS-3 , 1.5 × 150 mm を使用した (GL science 社製) . または , C30 deversil UG-5 , 4.6 × 250 mm (C30 分析カラム) (野村化学製) を使用した . 移動相溶媒には , 0.1% ギ酸および 0.1% ギ酸を含む CH₃CN の混合溶液を用い , 送液は , liner gradient で行った . 検出は *m/z* 100-1000 , PDA 200-600 nm で行った . 抗酸化活性画分の単離・精製の際に指標として

用いた分画物試料は , 次に示す通りである .

KZ34 の frc11-22b , frc37-22b , frc44, 45-29b , frc44, 45-21b , frc54-24c , frc25-28b , frc25-25c , fr32-33C .

B - 6 . 液々分配

KZ34 (15.07 g) を ethyl acetate (EtOAc) / 40% methanol 溶液 (AqMeOH) (1:1 , 計 1.0 L) で液々分配を行った . 次いで , 40% AqMeOH 層を EtOAc で 3 回抽出した . 得られた EtOAc 層は , 無水硫酸ナトリウムを加え , 一晚脱水した後 , エバポレーターで濃縮した .

EtOAc 層および 40% aqMeOH 層につき TLC-DPPH および LC/MS により確認した . その結果 , EtOAc 層において , DPPH ラジカル消去活性が確認され , かつ LC/MS による解析では , glabridin が顕著に検出された .

B - 7 . Sephadex LH-20 による EtOAc 層の分画

EtOAc 層は , MeOH に溶解させた後 , Sephadex LH-20 によるゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った . 分画は , 1 つの画分 (fr) につき 15 ~ 20 mL で溶出を行い , fr1 ~ fr96 までを得た . なお , 移動相には , methanol (MeOH) を用いた .

得られた画分について TLC-DPPH を行った結果 , fr5 ~ fr6 , fr10 ~ fr45 に強い活性が認められた . 次いで , TLC-DPPH と LC/MS の結果をもとに , fr1 ~ fr10 (**fr 0**) , fr11 ~ fr17 (**fr 1**) , fr18 ~ fr27 (**fr 2**) , fr28 ~ fr37 (**fr 3**) , fr38 ~ fr45 (**fr 4**) , fr46 ~ (**fr 5**) としてそれぞれの画分を合わせ , エバポレーターで濃縮した . さらに LC/MS で再測定した結果 , 目的の活性成分は **fr 2** に含まれていた .

B - 8 . YMC*GEL ODS-A による **fr 2** の分画

fr 2 を MeOH で完全に溶解させ , ODS を加えて , エバポレーターで濃縮し , ODS-**fr2** 粉末とした . ODS-**fr2** 粉末は , 逆相カラムにスラリーとして 1/3 量を負荷し , 逆相カラムクロマトグラフィーを , 計 3 回繰り返した . 30% aqMeOH , 40% aqMeOH , 60% aqMeOH , 80% aqMeOH の順で各 500 mL づつを用いて溶出し , 次いで , MeOH 1000 mL , CH₃CN 500 mL を順に用いて溶

出した .分画は ,1つの画分につき 15~20 mL で行った(1回目を fra2- , 2回目を frb2- , 3回目を frc2-と表記する) .得られた画分は TLC-DPPH および LC/MS で分析した .

1 回目の逆相クロマトグラフィーの結果 , fra2-50 , fra2-65 ~ fra2-70 , fra2-80 ~ fra2-85 付近にラジカル消去活性が認められた . 詳細な成分分布を確認する目的で , TLC-DPPH の結果をもとに fra2-45 ~ fra2-100 までの LC/MS 分析を行った . LC/MS と TLC-DPPH データを合わせて検討すると , 主に fra2-50 付近は , licochalcone B , fra2-65 ~ fra2-70 は , glabridin , fra2-80 ~ fra2-85 は , 推定分子量(MW) 354 の抗酸化活性成分を含有していた . 各画分は , 上記分析データをもとにエバポレーターで濃縮した .

2 回目の分画は , 1回目と同様の方法で行った . ただし , 30% aqMeOH , 40% aqMeOH での溶出は行わず , 60% aqMeOH での溶出から始め , frb2-1 ~ frb2-70 を得た . そのうち , frb2-1 ~ frb2-60 までを LC/MS で分析した . その結果 , 各活性成分の溶出は , 1回目の ODS 画分とほぼ同じ挙動を示した . よって , frb2-10 ~ frb2-16 , frb2-17 ~ frb2-26 , frb2-27 , frb2-28 , frb2-29 , frb2-30 , frb2-31 , frb2-32 , frb2-33 , frb2-34 , frb2-35 , frb2-36 , frb2-37 , frb2-38 , frb2-39 , frb2-40 , frb2-41 , frb2-42 , frb2-43 , frb2-44 , frb2-45 , frb2-46 , frb2-47 , frb2-48 , frb2-49 , frb2-50 ~ frb2-60 となるよう一部の画分は合わせた . 3 回目の分画は 2 回目と同様の方法で行った (frc2-1 ~ frc2-70) .

B - 9 . Licochalcone B の単離・精製

frb2-10 ~ 16 に含まれる licochalcone B を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 deversil UG-5 , 10.0 × 250 mm (C30 カラム) (野村化学) , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は , 156.0 mg であった .

B - 10 . Glabridin および kanzonol X の単離・精製

frb2-38 ~ 42 39 ~ 42 に含まれる glabridin , kanzonol X を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 50%

CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は , glabridin が 1035.7 mg , kanzonol X が 134.0 mg であった .

B - 11 . MW 354 の抗酸化活性成分および hispaglabridin A の単離・精製

frb2-45 に含まれる MW 354 の抗酸化活性成分と hispaglabridin A を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 55% CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は , hispaglabridin A が 231.5 mg であった .

MW 354 の抗酸化活性成分を含む画分は , 別の物質も含んでいたため , 再度精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 42% CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は , 59.5 mg であった .

B - 12 . MW 322 の抗酸化活性成分の単離・精製

frb2-31 に含まれる MW 322 の抗酸化活性成分を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 40% CH₃CN (4.0 mL/min)とした .

MW 322 の抗酸化活性成分を含む画分には別の物質も含まれていたため , 再度 , 分取 HPLC を行った . その条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 30% CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は 133.3 mg であった .

B - 13 . MW 358 および MW 370 の抗酸化活性成分の単離・精製

frb2-30 に含まれる MW 358 および MW 370 の抗酸化活性成分を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 35% CH₃CN (4.0 mL/min)とした .

C30 カラムでは , MW 358 および MW 370 の抗酸化活性成分は分離しなかったため , COSMOSIL PACKED COLUMN NAP , 4.6 × 250 mm (NAP カラム) (ナカライテスク株式会社製)を用いて単離・精製した . その分取 HPLC 条件は , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (1.0 mL/min)で行った . 単離収量は , MW 370 の成分は 27.2 mg , MW 358 の成分は 26.0 mg であ

った。

MW358 は夾雑物を含んでいたため、さらに分取 HPLC を行った。その条件は、C30 カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 35% CH₃CN (4.0 mL/min) で精製した。

なお、MW 358, MW 370 は、単離収量が少なかったため、frc2-30 より、上記と同様の方法で単離・精製した。

B - 14 . DPPH ラジカル消去活性測定

試験管、またはサンプリングチューブに試料溶液 200 μL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μL を添加して混合し、そこに DPPH 溶液 1 mL を加え、直ちに試験管ミキサーで 10 秒間撹拌した。その後、室温暗所にて静置した。DPPH 溶液の添加から正確に 30 分後に 517 nm の吸光度を測定した。吸光度測定のパランク溶液には 99.5% エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μL の混合液を用いた。

試料溶液添加時の吸光度を A_s 、試料溶液の代わりに 99.5% エタノールを添加した際の吸光度を A_c とし、次の計算式から阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

C. 結果及び考察

C - 1 . 抗酸化活性成分の単離・精製

図 1 に単離・精製のスキームを示す。

C - 2 . Licochalcone B の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で yellow であった。LC/MS では、KZ34 frc11-22b と保持時間 (R.T.)、UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 20.22 min, UV; λ_{\max} 368 nm, MS; m/z 285 [M+H]⁺, m/z 287 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ および methanol-*d*₄ に溶解させて行った。また、既報¹⁾の文献値(溶媒: methanol-*d*₄)をもとに帰属し licochalcone B と同定した。

C - 3 . Glabridin の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で pearl であった。LC/MS では、KZ34 frc37-22b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 50% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 23.42 min, UV; λ_{\max} 228, 281 nm, MS; m/z 325 [M+H]⁺, m/z 323 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ に溶解させて行った。市販標品のシフト値と比較し帰属した。

C - 4 . Kanzonol X の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で brown であった。LC/MS では、KZ34 frc44, 45-29b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 50% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 49.52 min, UV; λ_{\max} 207, 283 nm, MS; m/z 395 [M+H]⁺, m/z 393 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ に溶解させて行った。また、既報²⁾の文献値(溶媒: acetone-*d*₆)をもとに帰属した。

C - 5 . Hispaglabridin A の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で brown であった。LC/MS では、KZ34 frc54-24c と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 55% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 56.95 min, UV; λ_{\max} 229, 280, 293 nm, MS; m/z 393 [M+H]⁺, m/z 391 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ に溶解させて行った。また、chloroform-*d* に再溶解させて測定した。chloroform-*d* 中では難溶であり、C-7, C-9, C-2', C-4' の 4 級炭素が検出されなかったものの、既報³⁾の文献値(溶媒: chloroform-*d*)をもとに帰属し hispaglabridin A と同定した。

C - 6 . MW 354 の化合物の同定

LC/MS では、KZ34 frc44, 45-21b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、MS; m/z 355 [M+H]⁺, m/z 353 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ および chloroform-*d*

にそれぞれ溶解させて行った。また、既報³⁾の文献値(溶媒: chloroform-*d*)をもとに帰属し 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin と同定した。

C - 7 . MW 322 の化合物の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で white であった。LC/MS では、KZ34 frc32-33b と R.T. , UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 30% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 181.13 min , UV; λ_{\max} 214 , 248 , 284 , 295 , 324 nm , MS; m/z 323 [M+H]⁺ , m/z 321 [M - H]⁻ であった。

Glabrene は、既報⁴⁾の文献値(溶媒: methanol-*d*₄: chloroform-*d*=1:1)をもとに NMR 測定を行った。その結果、¹H NMR で -0.07 ppm の誤差、¹³C NMR で 0.8 ppm の誤差で帰属できた。なお 2次元 NMR による帰属も一致し glabrenec (cas no. 60008-03-9) と同定した。

C - 8 . MW 358 の化合物の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で brown であった。LC/MS は、KZ34 frc25-28b と R.T. , UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 35% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 37.65 min , UV; λ_{\max} 230 , 290 nm , MS; m/z 359 [M+H]⁺ , m/z 357 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は chloroform-*d* に不溶であったため、methanol-*d*₄ および acetone-*d*₆ に溶解させて行った。その結果、既知化合物であったため、既報⁵⁾の文献値(溶媒: acetone-*d*₆)をもとに帰属し cas no. 938190-35-3 の化合物であると同定した。

C - 9 . MW 370 の化合物の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で yellow であった。LC/MS の分析値は、NAP カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 114.07 min , UV; λ_{\max} 255, 364 nm , MS; m/z 371 [M+H]⁺ , m/z 369 [M - H]⁻ であった。なお、この分析値は、既報⁶⁾の LC/MS の UV および MS の値と一致した。

NMR 測定は chloroform-*d* に難溶であったた

め、methanol-*d*₄ および acetone-*d*₆ に溶解させて行った。以上の結果、既知化合物であった。よって、既報⁵⁾の文献値(溶媒: acetone-*d*₆)をもとに帰属し cas no. 905708-40-9 の化合物であると同定した。

C - 10 . 単離・精製画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)

単離・精製画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)測定の結果を、表 1 に示す。いずれの画分も活性が認められた。

今後、各画分に含まれる単離成分の純度を ¹H-qNMR 等の手法により確認することで、各成分の単位量当たりの活性(比活性)を算出することができると考えられる。

D . 結論

本研究では、*G. glabra* 由来のカンゾウ油性抽出物流通製品において抗酸化活性寄与率の高かった 8 成分の単離・精製を行った。これらの単離・精製物は、LC/MS 分析で、各抗酸化活性物質の指標となる分画物試料と R.T. , UV および MS スペクトルが一致した。各単離・精製物構造解析結果から、未同定であった 4 成分の同定を行った。その結果 4 成分(MW 322, 354, 358, 370) の化合物を同定した。なお、これらの同定成分の内、MW 370 および MW 358 の化合物は、これまでの報告⁵⁾において DPPH ラジカル消去活性を有することは報告されていないが、今回のこれらの単離画分は抗酸化活性を示した。また、既に市販標品や単離標品との比較や LC/MS/MS により同定していた 4 種の抗酸化成分(glabridin , licochalcone B , kanzonol X および hispaglabridin A) 相当画分についても単離・精製を行い、NMR 測定を行ったところ、同定に問題ないことが確認された。

本研究より、カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性に glabridin だけではなく、licochalcone B , kanzonol X , hispaglabridin A , 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin および glabrene 等多数の化合物が関与していることが示された。

E. 参考文献

- 1) Kiichiro Kajiyama, Sachio Demizu, Yukio Hiraga, Kaoru Kinoshita, Kiyotaka Koyama, Kunio Takahashi, Yukiyo Tamura, Kenzo Okada, Takeshi Kinoshita. Two prenylated retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, **31**(9), 3229-3232 (1992).
- 2) Toshio Fukai et.al. Isoprenylated flavonoids from underground parts of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry*, **43**(5), 1119-1124 (1996).
- 3) Takeshi Kinoshita et.al. Isoflavan derivatives from *Glycyrrhiza glabra* (Licorice). *Heterocycles*, **43**(3), 581-588 (1996).
- 4) Takeshi Kinoshita, Yukiyo Tamura, Kenji Mizutani. Isolation and synthesis of two new 3-arylcoumarin derivatives from the root of *Glycyrrhiza glabra* (Licorice), and structure revision of an antioxidant isoflavonoid, glabrene. *Natural Product Letters*, **9**, 289-296 (1997).
- 5) Minpei Kuroda, Yoshiro Mimaki, Shinichi Honda, Hozumi Tanaka, Shinichi Yokota. Phenolics from *Glycyrrhiza glabra* roots and PPAR- ligand-binding activity. *Bioorganic and medicinal chemistry*, **18**, 962-970 (2010).
- 6) 多田 敦子, 受田 浩之, 島村 智子, 石附 京子, 杉本 直樹. 厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) 既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究: 平成25年度分担研究報告書: 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

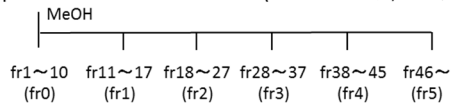
なし

カンゾウ油性抽出物 KZ34 15.07 g

EtOAc層 / 40% aqMeOH層

| EtOAc で40% aqMeOH層を3回抽出

Sephadex LH-20による分画化 (2回繰り返す, 1frあたり~20 mL)



YMC*GEL ODS-AIによる分画化 (3回繰り返す, 1frあたり~20 mL)

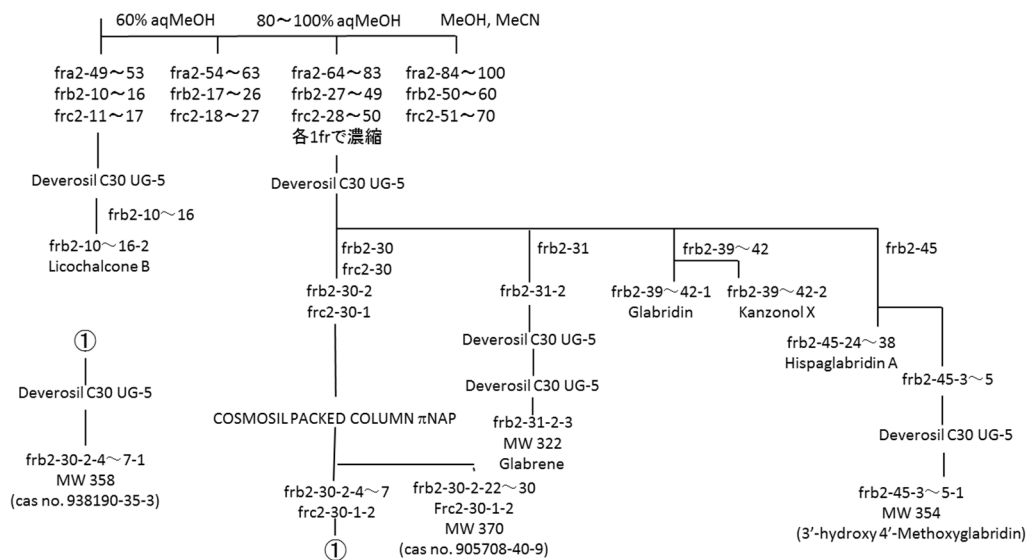


図 1 カンゾウ油性抽出物における単離・精製のスキーム

表 1 単離・精製画分の DPPH ラジカル消去活性測定結果

	サンプル重量 (mg)	原液濃度 (mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)	TEAC (μg TE/μg sample)
Licochalcone B	3.18	1.590	0.0444	44.36	1.65
Glabridin	2.55	1.275	0.2857	285.71	0.26
Hispaglabridin A	1.91	0.955	0.0937	93.72	0.78
Kanzonol	1.90	0.950	0.1493	149.25	0.49
MW 354	2.20	1.100	0.6320	631.95	0.12
MW 358	1.91	0.955	0.1910	190.99	0.38
MW 370	2.01	1.005	0.1824	182.37	0.40
MW 322	5.52	2.760	0.2214	221.42	0.33
	Trolox IC ₅₀ = 72.99 μg/mL				