

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成31年度(令和元年)研究分担報告書

既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

～レイシ抽出物の成分解析～

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 レイシ抽出物は既存添加物名簿に記載され、「レイシ抽出物（マンネンタケ（*Ganoderma lucidum* Karst.）の菌糸体若しくは子実体又はその培養液から抽出して得られたものをいう）のうち、子実体から得られたものである」と定義される苦味料である。本添加物の品質規格作成のための化学的検討として、これまで薄層クロマトグラフィー（TLC）による分析〔酢酸エチル/メタノール/水/ギ酸系溶媒で展開し、紫外線（UV）照射による検出〕により明瞭な数個のスポットを確認している。本年度は、これらスポットについて各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を行い、各種機器分析データに基づく成分解析の結果、TLC分析（UV照射検出）における指標成分の候補として、lucidenic acid A及びlucidenic acid Dを見出した。これら以外にスポットが数個認められ、それら成分についてさらに検討が必要とされる。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 准教授

A. 研究目的

レイシ抽出物は既存添加物名簿に記載され、「レイシ抽出物（マンネンタケ（*Ganoderma lucidum* Karst.）の菌糸体若しくは子実体又はその培養液から抽出して得られたものをいう）のうち、子実体から得られたものである」と定義されている。基原・製法・本質は、サルノコシカケ目マンネンタケ（*Ganoderma lucidum* KARST.）の菌糸体若しくは子実体、又はその培養液より、水、エタノール又は二酸化炭素で抽出して得た苦味料とされる。¹⁾本添加物については、日本食品添加物協会発行の第4版既存添加物自主規格に確認試験が記載されているが、²⁾その他の成分情報に関するデータは乏しく、検討課題の一つとしてあげられる。このような背景に基づき、本添加物の品質規格作成に向けた成分データの集積を目的に、これまで高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及び薄層クロマトグラフィー（TLC）分析による検討を行い、逆相 HPLC 分析では紫外線（UV）検出による主要なピークは認められなかった。一方、

TLC 分析の結果、酢酸エチル（EtOAc）/メタノール（MeOH）/水（H₂O）/ギ酸（HCOOH）系溶媒で展開し、UV 照射による検出で、*R_f* 値 0.6 付近に明瞭な数個のスポットが確認され、これらスポットの成分解析が課題としてあげられていた。³⁾そこで本年度は、これらスポットの分離精製を実施し、化合物の解析を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

レイシ抽出物は日本食品添加物協会を通じて入手した。標品として用いた ganoderic acid A, B, C1, C2, H, lucidenic acid A, D は ChemFaces 社製を用いた。試薬はすべて特級または HPLC 用を用いた。

B-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：254 nm、移動相：（A）0.1%ギ酸-蒸留水及び（B）0.1vol%ギ酸-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%)]. TLCは, TLC Silica gel 60F₂₅₄ plate (Merck 社製) を用いた. 展開溶媒は酢酸エチル/メタノール/水/ギ酸混液 (20:2:1:0.01), 検出は UV 照射 (254 nm), 注入量は 1~10 μ L.

NMRは Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し, 測定溶媒としてメタノール (MeOH)-*d*₄を用いた. ケミカルシフトは溶媒由来ピーク [MeOH-*d*₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm)] を基準とした. 高分解能 (HR) ESI-MSは micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用した.

B-3) 試料調製及び化合物の単離

試料約 0.1 g を MeOH (10 mL) に加え超音波処理後, 遠心分離して得られた上澄みを試料溶液とした. 試料溶液について, 各種カラムクロマトグラフィー (Diaion HP-20, Silica gel, YMC gel ODS-AQ, 分取 TLC) による分離精製を繰り返し, 化合物の単離を行った. 単離した化合物については標品の分析データとの直接比較, あるいは文献値と比較することにより行った.

C. 結果及び考察

C-1) TLC 分析条件の検討

レイシ抽出物の TLC 分析条件について, 展開溶媒を検討した結果, EtOAc/MeOH/H₂O/HCOOH (20:2:1:0.01) で展開し, UV (254 nm) 照射することで数個のスポットを確認した. 次に, 抽出溶媒について検討した. レイシ抽出物 (100 mg) を MeOH, アセトン, エタノール (EtOH), H₂O, EtOAc (各 1 mL) で抽出し, 3 分間超音波処理後, 遠心分離した. 上澄みを試料溶液として用い, TLC による比較検討を行った結果, MeOH を抽出溶媒として用いた試料溶液のスポットが明瞭に検出された (図 1a)。また, スポットする試料濃度については 100 mg/mL の試料溶液 1 μ L の注入で明瞭にスポットが確認できた (図 1b)。

C-2) 分離精製

レイシ抽出物 (20 g) に MeOH (40 mL) を加えて超音波処理後, 遠心分離し, MeOH 可溶部について Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより 50~80%MeOH, MeOH で順次溶出し各溶出部を得た. TLC 分析の結果, 80%MeOH 及び MeOH 溶出部に明瞭なスポットが観察されたため, それら溶出部 (各 500 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより EtOAc, EtOAc/MeOH (9:1→8:2→7:3→6:4→5:5), MeOH で順次溶出し, 各フラクションを得た. 得られたフラクションについて TLC 分析を行った結果, 比較的スポットが分離して観察された EtOAc 溶出部 (458.1 mg) について, さらに分取 TLC を繰り返し, 単一なスポットとして Zone 2 (17.5mg) 及び 4 (5.5mg) を得た. Zone 2 及び 4 について構造解析した結果, それぞれ lucidenic acid D, lucidenic acid A と同定した (図 2). 各化合物の構造は, NMR 等の機器分析データを文献値と比較及び標品のスペクトルデータを直接比較することにより同定した.⁴⁾ 化合物の HR-ESI-MS 及び ¹³C-NMR データを以下に記す.

Lucidenic acid A: HR-ESI-MS: *m/z* 513.2506 [M-H]⁻ (calcd for C₂₉H₃₈O₈-H: 513.2494). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 219.6 (C-15), 218.7 (C-3), 200.1 (C-11), 159.9 (C-8), 142.3 (C-9), 67.2 (C-7), 60.4 (C-14), 51.3 (C-12), 49.5 (C-5), 49.3 (C-4), 47.8 (C-17), 46.3 (C-13), 42.0 (C-16), 39.3 (C-10), 36.7 (C-23), 36.4 (C-20), 35.1 (C-2), 29.0 (C-6), 27.5 (C-25), 25.2 (C-27), 21.1 (C-26), 18.7 (C-19), 18.4 (C-21), 18.1 (C-18).

Lucidenic acid D: HR-ESI-MS: *m/z* 457.2607 [M-H]⁻ (calcd for C₂₇H₃₈O₆-H: 457.2596). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 217.9 (C-3), 208.6 (C-15), 200.7 (C-7), 195.8 (C-11), 171.7 (-Acetyl-CO), 80.6 (C-12), 59.9 (C-14), 51.8 (C-5), 49.8 (C-13), 49.3 (C-4), 48.0 (C-17), 46.2 (C-10), 40.6 (C-16), 38.1 (C-1), 38.1 (C-2), 35.0 (C-6), 34.7 (C-20), 33.9 (C-23), 31.2 (C-22), 27.7 (C-25), 20.9 (C-27), 20.9 (-CH₃), 20.8 (C-26), 20.6 (C-21), 19.1 (C-19), 12.5 (C-18).

同定した2成分以外のスポットについても単離を試みたが、得られたフラクションを HPLC 分析すると単一のピークとして得ることができなかった。よって、今後さらに分離精製を検討する必要がある。

C-3) 成分解析

TLCにより検出し、同定された2成分を含むレイシ含有成分を用い、HPLCにより検出されたピークについて成分プロファイリングを行った。その結果、7成分を同定した(図3)。未同定のピークは数ピークあるため、今後これらを含めた成分解析が課題とされる。

D. 結論

TLC分析により検出されるレイシ抽出物の特徴的な成分として、*lucidenic acid A* 及びDの2成分が見出された。また、HPLC分析によりこれら2成分以外の5成分(*ganoderic acid A, B, C1, C2, H*)のピークが認められた。一方で、今回明らかにした成分以外に、スポットやピークが複数観察されたため、その他の成分についてさらに検討が必要とされる。TLCによる確認試験では、一成分を指標とするのが相応しいが、レイシ抽出物については複数の成分を指標にする確認が適当であることが示唆された。最も適した指標成分を明らかにすることで、確認試験への応用が期待される。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第120号(1996)“既存添加物名簿”平成8年4月16日
- 2) 第4版既存添加物自主規格, 平成20年10月, 日本食品添加物協会
- 3) 厚生労働科学研究補助金(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29年度分担報告書
- 4) Komoda Y, Nakamura H, Yamazaki K, Ishihara S, Uchida M, Kohda H, Yamasaki K.: Structures of new terpenoid constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) KARST

(Polyporaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4829-4835 (1985).

F. 研究業績

1. 学会発表

- 1) 天倉吉章, 好村守生, 村井 望, 重松優里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物レイシ抽出物及びカキ色素の成分解析. 日本薬学会第140年会(2020.3.5)(日本薬学会第140年会Web要旨集)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

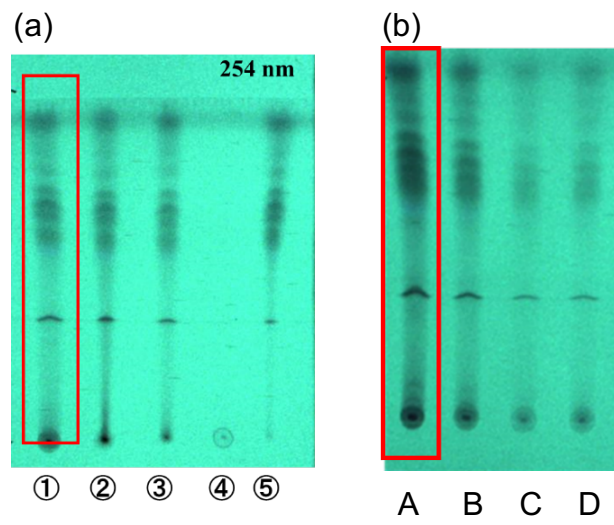


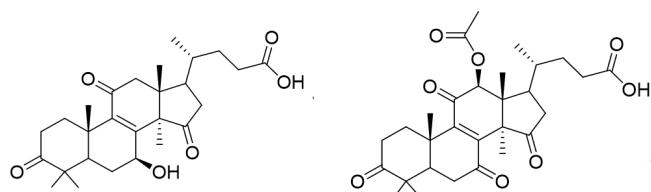
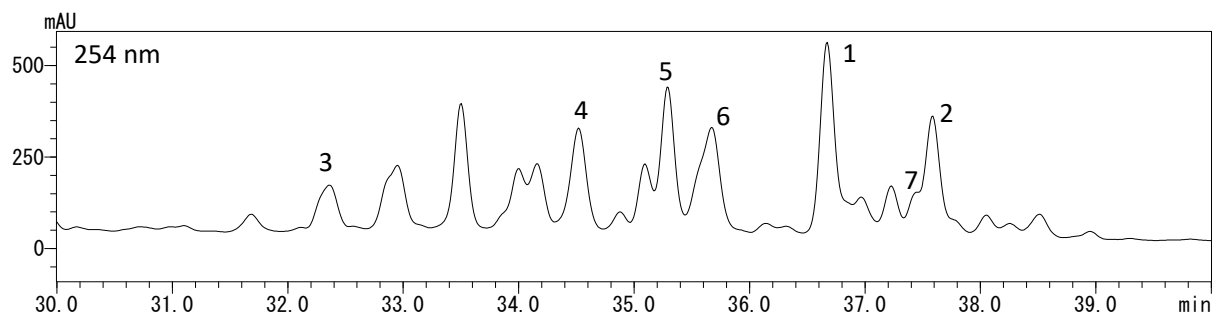
図 1. TLC 分析 (254 nm)

(a) 抽出溶媒の検討

① MeOH, ② Acetone, ③ EtOH, ④ H₂O, ⑤ EtOAc

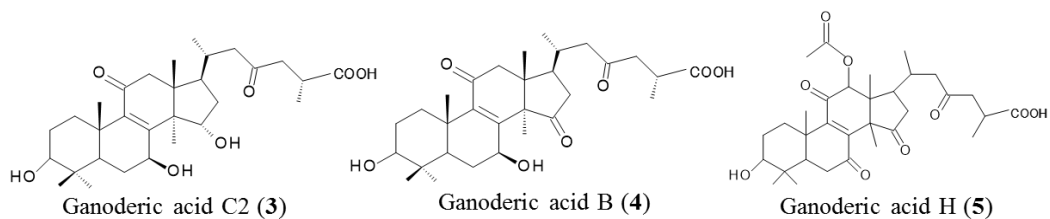
(b) 試料濃度の検討

A 100 mg/mL, B 50 mg/mL, C 25 mg/mL, D 20 mg/mL



Lucidenic acid A (1)

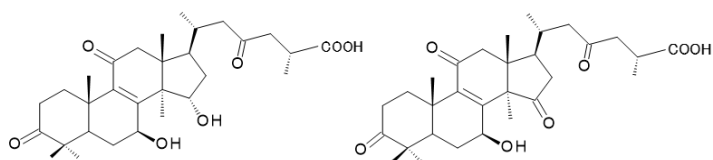
Lucidenic acid D (2)



Ganoderic acid C2 (3)

Ganoderic acid B (4)

Ganoderic acid H (5)



Ganoderic acid A (6)

Ganoderic acid C1 (7)

図3. HPLC 分析と同一した化合物の構造