

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

(R1-食品-一般-007)

平成31年度(令和元年度)研究分担報告書

既存添加物の含有成分解析に関する研究

～チャ抽出物の成分規格の検討～

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

研究要旨 チャ抽出物 (Tea Extract) は、第4版既存添加物自主規格に記載されており、主成分は、カテキン類とされている。現在では、確認試験において、吸光度法 (540 nm) により確認試験を実施して、カテキン類の総量を定量している。しかしながら、8種類全てのカテキン類に関して、個々の成分組成は規定されていない。そこで、昨年度では、それら標準品を用いて、チャ抽出物におけるカテキン類を逆相系HPLCで測定した。紫外可視検出器および蛍光検出器を用いて定量した結果、チャ抽出物では3種類のカテキン類が確認され、特にエピガロカテキンが高濃度で検出された。しかしながら、これらのカテキン類の定量用標準品は高価格であり、標準品を全て入手することは困難である。そこで、今年度では、8種類のカテキン類のシングルリファレンスHPLC法を構築することにより、簡便かつ汎用性高い定量法を提案することとした。その結果、紫外可視検出器および蛍光検出器にてチャ抽出物中の3種全てのカテキン類を同時に定量することができた。

A. 研究目的

チャ抽出物 (Tea Extract) の定義は、ツバキ科チャ (*Camellia sinensis* O. Kze.) の葉より、室温時、温時又は熱時、水、酸性水溶液、含水エタノール、エタノール、含水メタノール、アセトン、酢酸エチル又はグリセリン水溶液で抽出したものより得られたものであると第4版既存添加物自主規格に規定されている¹⁾。チャ抽出物は酸化防止剤、製造溶剤などに用いられ、主成分はカテキン類である。現在では、吸光度法 (540 nm) によるカテキン類の総量を定量する方法が採用されているが、産地や製造過程の違いによりカテキン類の成分組成が異なると報告されている。ゆえに、昨年度の報告では、代表的な8種カテキン類 (カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレート) を対象とし、逆相系高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) を用いて一斉分析法を構築した (図 1)。なお、検出器は UV (280 nm) および FL (Ex:

280 nm, Em: 310 nm) に設定して最適化した。その結果、8種のカテキン類をグラジエント条件にて25分以内に全て検出することができた。この分析法を用いてチャ抽出物中のカテキン類を定量した結果、主にエピガロカテキンガレート、エピカテキンガレートおよびエピカテキンが含まれていることが確認できた。しかしながら、これらカテキン類の分析用標準品は高額であり、全ての標準品を入手し定量することは煩雑である。そこで、本年度は、これら8種類のカテキン類に対してシングルリファレンスHPLC定量法を構築することにより、カテキン類の高精度かつ汎用性高い定量法を目指した。

シングルリファレンス (Single Reference, SR) -HPLC 定量法は、SR に対する分析対象物質の相対モル濃度 (Relative Molar Sensitivity, RMS) を設定することにより、その定量分析ではそれぞれの標準品を用いずに定量できる安価かつ簡便な分析手法である。これまでの報告において、紫外可視吸光度検出器 (UV 検出器) を用いて SR-HPLC 定量法の開発を述べてきた。ゆえに、今年度では、UV 検出器に限らず、より高

感度かつ特異性の高い蛍光検出器 (FL 検出器) を用いることにより, カテキン類 8 種類の一斉分析法を構築することとした。

B. 研究方法

チャ抽出物は, 三栄源エフエフアイ社製のものを用いた。 (+) -カテキン水和物 (Catechin, C), (-) -エピカテキン (Epicatechin, EC), (-) -エピガロカテキン (Epigallocatechin, EGC), (-) -エピカテキンガレート (Epigallocatechin gallate, ECg) は東京化成工業社製を用いた。 (-) -カテキンガレート (Catechin gallate, Cg), (-) -ガロカテキン (Gallocatechin, GC), (-) -ガロカテキンガレート (Gallocatechin gallate, GCg) は長良サイエンス社製を用いた。 なお, SR 候補化合物であるセサモール (Sesamol, SM) は富士フィルム和光純薬社製, 2, 6-ジメトキシフェノール (2, 6-Dimethoxy Phenol, DMP) および 1, 2-ジメトキシベンゼン (1, 2-Dimethoxy Benzene, DMB) は東京化成社製を用いた。

電子天秤: メトラー製 METTLER ML303/52
HPLC 装置: 島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/RF-10AXL/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS システム

チャ抽出物の LC 分離分析: 対象試料は水/メタノール混液 (50/50, V/V) により調製した。 移動相には, 0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1% ギ酸メタノール (B) を使用し, A/B: 80/20 をグラジエントにより, 40 分間の分析を行った。

カラム: TSKgel ODS-100Z column (4.6×150 mm, 5 μm, 東ソー社製)
カラム温度: 40°C
流速: 1.0 mL/min
UV 検出波長: 200-500 nm (定量: 280 nm)
FL 検出波長: 励起波長 280 nm, 蛍光波長 310 nm
注入量: 10 μL
移動相: 0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1% ギ酸メタノール (B)

グラジエント条件: A/B: 80/20 (0 min) →60/40 (30 min) →5/95 (30.1 min) →5/95 (35 min) →80/20 (35.1 min) →80/20 (40 min)

定量 NMR による純度評価
装置: ECA600 (JEOL 社製)
データ数: 60, 000
パルス角: 90°
遅延時間: 64 秒
繰り返し回数: 16 回
観測幅: -5~15 ppm
溶媒: 重アセトン

カテキン類に対する SR のデザイン: カテキンにヨードメタンを反応させ, カテキンのメチル誘導体を合成した。 また, カテキン類の部分骨格に注目し, SR, DMP および DMB を SR 候補化合物とした。

RMS の算出: 8 種のカテキン類および 3 種の SR 候補化合物について, 0~22.5 ppm で絶対検量線を作成した。 各 SR に対するカテキン類の検量線の傾きの比より, RMS を算出した。

SR-HPLC 定量法の妥当性評価: 本分析法を用いて, チャ抽出物中における各カテキン類の定量を実施した。 なお, それと同時に絶対検量線法による定量分析も行い, その定量値を比較した。 さらに, 異なる測定環境および HPLC 装置間において定量値の再現性を確認した。

C. 研究結果

まず, SR 候補化合物の選定を検討した。 一般的に, SR は分析対象物質と物理的・化学的に同等のもの, かつ, 同分析条件上で高分離な化合物を選定する。 初めに, カテキンの水酸基をメチル化することにより, SR を合成デザインした (図 2)。 合成デザインした SR を HPLC 分析した結果, 化合物の保持が強く, 分析対象より

も明らかに異なる保持時間を示すこととなった。その原因は、カテキンの全ての水酸基がメチル化されたことにより、脂溶性が増し、ODSに対する保持が極端に向上したと考えられる。その一方で、特異的に水酸基をメチル化する合成は難しく、本アプローチは断念した。次に、カテキンの全体構造ではなく、部分構造に着目し、市販されるSM, DMPおよびDMBをSR候補化合物として選定した。これらをHPLCで分析した結果、どれもカテキン類のUV検出波長(280 nm)かつ分析時間以内にピークが検出された(図3)。

カテキン類およびSR候補化合物の純度評価を、定量NMR (¹H-qNMR)により実施した(表1)。その結果、どの化合物も純度が85%以上であり、そのRSD%も3%以下であった。その後、LC用原液を用いて絶対検量線を作成した結果、相関係数が0.998以上の良好な直線性を示せた。得られた絶対検量線より、各SR候補化合物に対するカテキン類の検量線の傾きを算出し、RMSを求めた。まず、国立医薬品食品衛生所保有の島津製作所社製およびWaters社製HPLC装置、立命館大学保有の島津製作所社製HPLC装置を用いて算出したRMSを比較した(表2)。その結果、GCの保持時間が重アセトンピークと重なり、RMSを産出することができなかった。また、EGCではRMSにばらつきがみられた。しかしながら、それ以外のカテキン類において、分析環境や装置が異なる場合でも同等のRMSが得られた。また、立命館大学の装置にて、異なる検量線の濃度幅(0~5 ppm, 5~22.5 ppm, 0~22.5 ppm)において、RMSを比較した結果、どの濃度幅において再現性が高いことが確認された(表3)。しかし、FL検出器においてCおよびECのRMSを算出した際、SMとDMBのRMS値が大きく異なっていた。

算出したRMSを用いて、チャ抽出物中におけるカテキン類のSR-HPLC定量法を実施した。3種類SR候補化合物をそれぞれ用いてカテキン類を定量し、従来の絶対検量線法による定量値と比較してみた。その際、SR候補化合物の

添加濃度を2.0 ppm, 4.0 ppmおよび8.0 ppmとした(表5)。その結果、UV検出器を用いたECgおよびEGCgの定量値は、絶対検量線法と同等であり、SRの添加濃度を変更しても定量値の変化はごく僅かであった。FL検出器を用いたECの定量値を絶対検量線法と比較すると、DMBではほぼ同等の定量値であったが、SMでは大きく異なっていた。以上の結果より、UV検出器かつFL検出器を用いて、8種類のカテキン類のSR-HPLC法を構築した結果、カテキン類のSRはDMBが最適であり、その精度や再現性は絶対検量線法による定量値とほぼ同等であった。

D. 考察

本研究では、チャ抽出物における8種類のカテキン類のSR-HPLC定量法を構築した。SM, DMPおよびDMBをSR候補化合物として用いて検討した結果、UV検出器では従来の絶対検量線法と同等の定量値が得られ、再現性や高精度を評価することができた。一方、FL検出器では、DMBと異なり、SMを用いて定量した場合、絶対検量線と定量値が大きく異なっていた。これは、FL検出器での分析対象物質であるECとSMでは蛍光強度が大きく異なっていたため、RMSが正確に算出できなかったと考えられる。ゆえに、FL検出器を用いてSR-HPLC法を構築する際は、分析対象物質と蛍光強度が同等であることが必要であるといえる。以上のことにより、本手法は分析対象物質の標準品を入手できなくても、正確に8種のカテキン類を正確かつ簡便に定量可能であると考えられる。

E. 結論

カテキン8種類を対象にSR-HPLC定量法を検討した結果、8種類全て定量することが可能であった。本研究では、3種類SR候補化合物の中で、DMBがUV検出器およびFL検出器のどちらでも使用可能であり、その正確性および再現性も良好であった。ゆえに、本分析法に基づく試験の提案が求められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

1) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: カテキン類の一斉分析を目指したシングルリファレンス HPLC 定量法の開発 日本食品化学学会第 25 回総会・学術大会 (長野県松本市) (2019. 6)

G. 知的財産権の出願, 登録状況

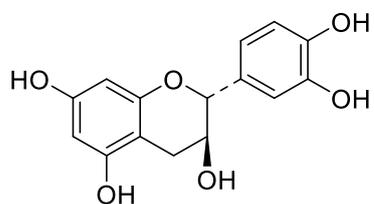
特になし

H. 健康危機情報

特になし

I. 参考文献

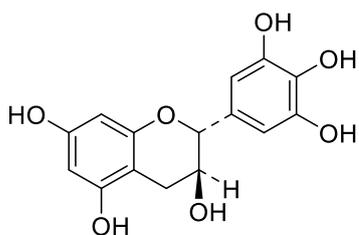
- 1) 日本食品添加物協会; 第 4 版既存添加物自主規格 平成 20 年 10 月 13 日発行
- 2) Yang, C. S., Maliakal, P., & Meng, X. ; *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 16, 6477-6483. (2005)
- 3) Cheng, T. O. ; *Am J Cardiol.* 91, 1290-1291. (2003)
- 4) M. S. El-Shahawi. , A. Hamza, S. O. Bahaffi, A. A. Al-Sibaai, T. N. Abduljabbar; *Food Chem.* 134, 2268-2275. (2012)



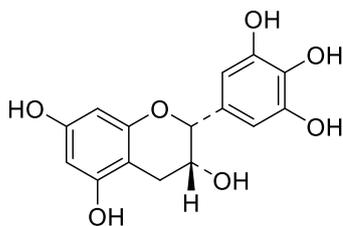
カテキン



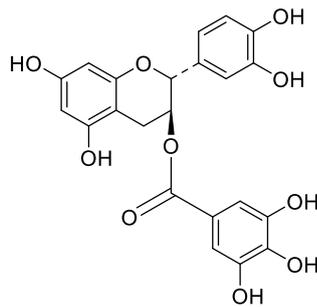
エピカテキン



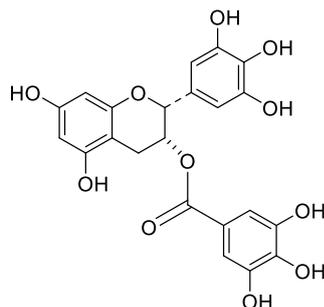
ガロカテキン



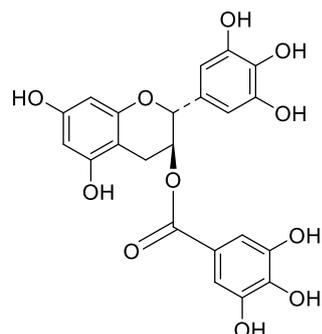
エピガロカテキン



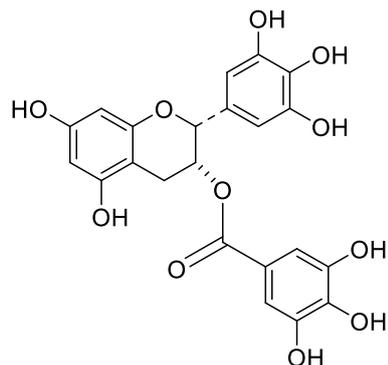
カテキンガレート



エピカテキンガレート



ガロカテキンガレート



エピガロカテキンガレート

図1 カテキン類の化学構造

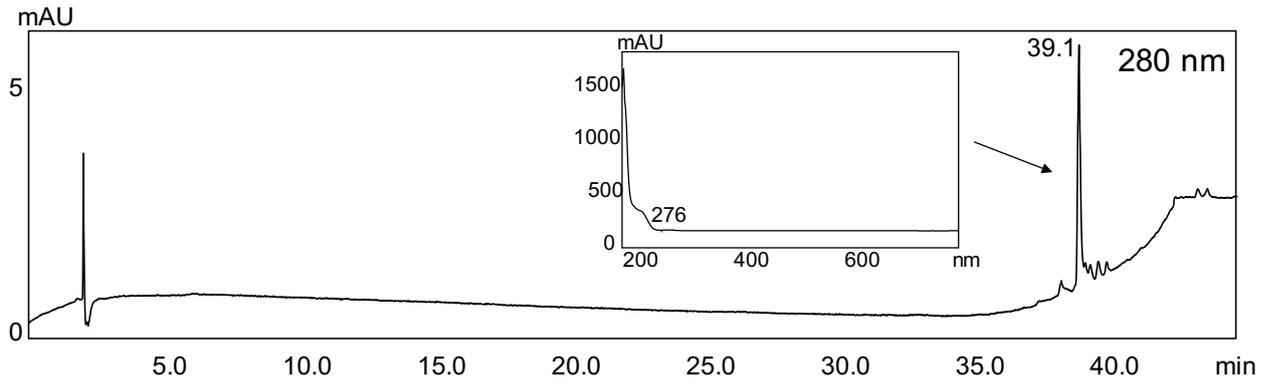
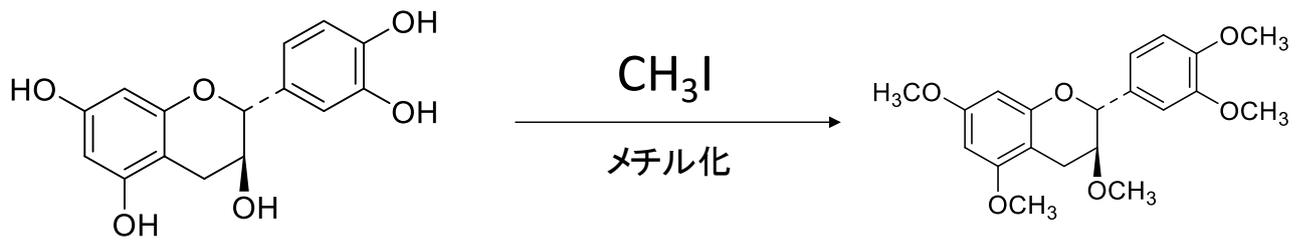


図2 メチル化によるSRの検討結果

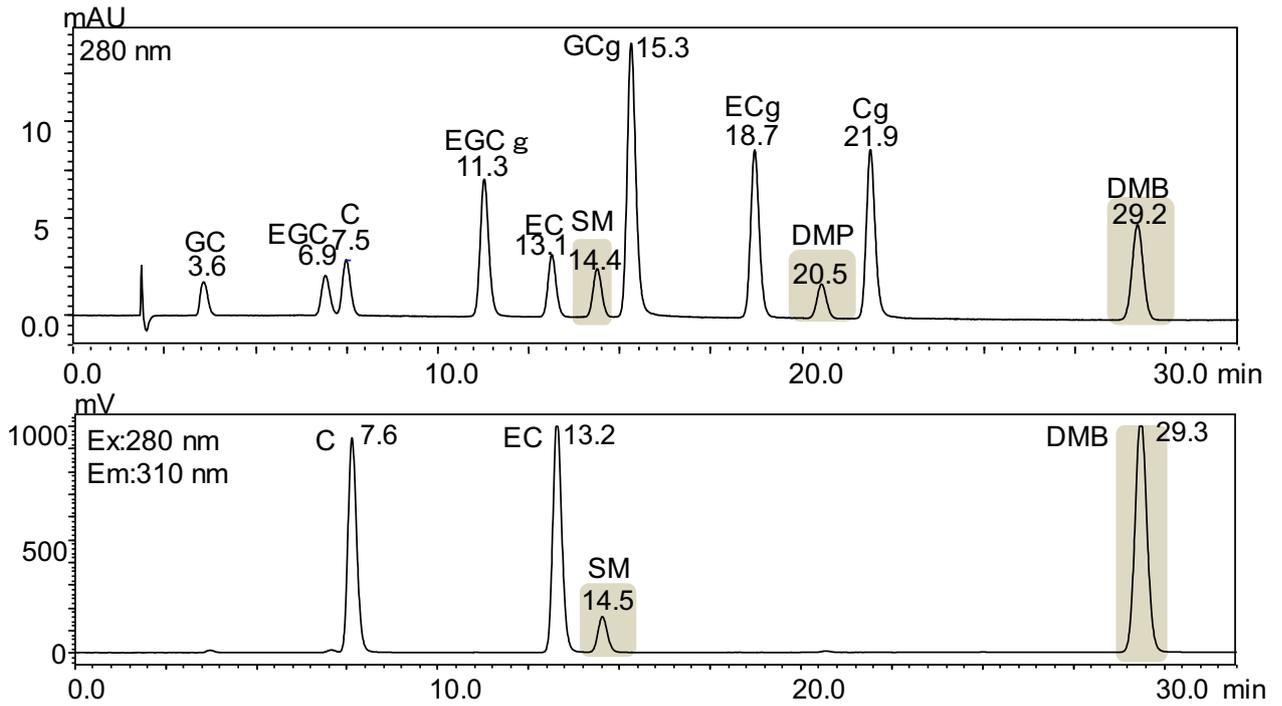
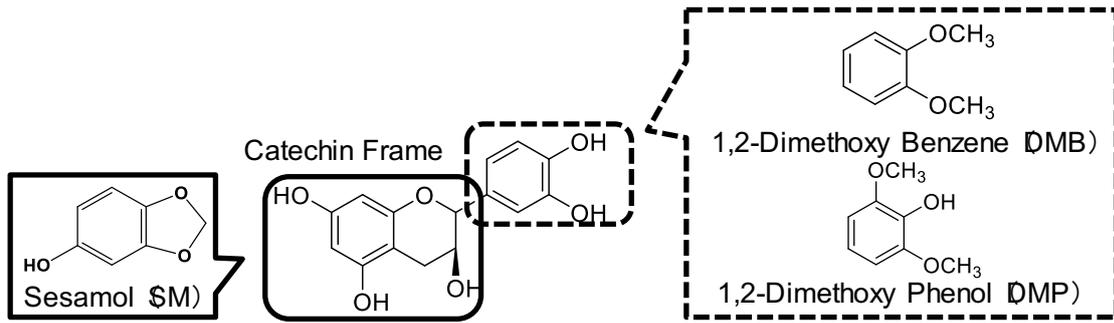


図3 カテキン類およびSRのHPLCクロマトグラム

表 1 定量 NMR による純度評価

カテキン類	純度 (%)	RSD%
C	94.1	0.6
EC	100.3	0.1
GC	87.0	0.3
EGC	93.3	0.2
Cg	93.7	0.1
ECg	97.7	0.7
GCg	86.1	0.21
EGCg	94.6	0.8
SM	100.3	0.01
DMP	100.0	0.8
DMB	99.3	0.01

n=3

表 2 異なる装置間・環境における RMS

	SR	RMS			RMS (平均値)	S.D.	RSD%
		島津製作所社製HPLC (国立衛研)	Waters製HPLC (国立衛研)	島津製作所社製HPLC (立命館大学)			
C	SM	1.45	1.15	1.42	1.34	0.13	10.0
	DMP	0.25	0.26	0.20	0.24	0.02	10.0
	DMB	1.25	1.33	1.35	1.31	0.04	3.4
EC	SM	1.43	1.14	1.45	1.34	0.14	10.3
	DMP	0.25	0.26	0.21	0.24	0.02	8.8
	DMB	1.23	1.33	1.38	1.31	0.06	4.7
GC	SM	-	-	4.61	4.61	-	-
	DMP	-	-	0.67	0.67	-	-
	DMB	-	-	5.36	5.36	-	-
EGC	SM	10.76	3.78	5.61	6.71	2.96	44.0
	DMP	1.85	0.85	0.81	1.17	0.48	41.1
	DMB	9.30	4.38	5.36	6.35	2.13	33.5
Cg	SM	0.54	0.49	0.56	0.53	0.03	5.5
	DMP	0.09	0.11	0.08	0.09	0.01	13.0
	DMB	0.47	0.57	0.53	0.52	0.04	8.1
Ecg	SM	0.61	0.51	0.53	0.55	0.04	7.7
	DMP	0.11	0.12	0.08	0.10	0.02	16.5
	DMB	0.53	0.60	0.51	0.54	0.04	6.7
GCg	SM	0.75	0.66	0.81	0.74	0.06	8.3
	DMP	0.13	0.15	0.12	0.13	0.01	10.1
	DMB	0.64	0.77	0.78	0.73	0.06	8.3
EGCg	SM	0.72	0.59	0.78	0.70	0.08	11.4
	DMP	0.12	0.13	0.11	0.12	0.01	6.8
	DMB	0.62	0.68	0.74	0.68	0.05	7.2

表 3 異なる濃度範囲における各カテキン類の RMS

カテキン類	SR	RMS			平均値	RSD%
		0-5 ppm	5-20 ppm	0-20 ppm		
C	SM	1.41	1.42	1.42	1.41	0.2
	DMP	0.20	0.21	0.20	0.20	2.2
	DMB	1.31	1.36	1.35	1.34	1.5
EC	SM	1.45	1.45	1.45	1.45	0.1
	DMP	0.20	0.21	0.21	0.21	1.9
	DMB	1.35	1.38	1.38	1.37	1.3
GC	SM	4.64	4.61	4.61	4.62	0.3
	DMP	0.64	0.67	0.67	0.66	1.7
	DMB	5.30	5.36	5.36	5.34	0.6
EGC	SM	5.70	5.60	5.61	5.64	0.8
	DMP	0.79	0.81	0.81	0.80	1.2
	DMB	5.30	5.36	5.36	5.34	0.6
Cg	SM	0.57	0.56	0.56	0.56	1.3
	DMP	0.08	0.08	0.08	0.08	0.8
	DMB	0.53	0.53	0.53	0.53	0.1
ECg	SM	0.56	0.53	0.53	0.54	2.2
	DMP	0.08	0.08	0.08	0.08	0.1
	DMB	0.52	0.51	0.51	0.51	0.8
GCg	SM	0.85	0.81	0.81	0.82	2.2
	DMP	0.12	0.12	0.12	0.12	0.1
	DMB	0.79	0.78	0.78	0.78	0.8
EGCg	SM	0.80	0.78	0.78	0.79	1.5
	DMP	0.11	0.11	0.11	0.11	0.6
	DMB	0.74	0.74	0.74	0.74	0.1

表4 蛍光検出器におけるカテキンおよびエピカテキンのRMS

カテキン類	SR	RMS値	
C	SM	0.00013	
	DMB	1.27	
EC	SM	0.00013	
	DMB	1.30	n=3

表 5 チャ抽出物を用いたシングルリファレンス HPLC 法と
絶対検量法の定量値の比較

UV検出器	RMS法, 定量値 (ng/g)			絶対検量線法 定量値 (ng/g)
	SM	DMP	DMB	
ECg	SR 2.0 ppm	22	27	24
	SR 4.0 ppm	22	26	24
	SR 8.0 ppm	22	25	24
EGCg	SR 2.0 ppm	740	860	800
	SR 4.0 ppm	740	880	920
	SR 8.0 ppm	760	900	760
FL検出器	RMS法, 定量値 (mg/g)		絶対検量線法 定量値 (mg/g)	
	SM	DMB		
EC	SR 2.0 ppm	0.0030	8.6	
	SR 4.0 ppm	0.0030	8.7	9.1
	SR 8.0 ppm	0.0027	9.0	

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(令和元年度)研究分担報告書

既存添加物の含有成分解析に関する研究

～シタン色素の成分規格の検討～

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

要旨 シタン色素 (Sandalwood Red) は日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」に記載されており、シタン (*Pterocarpus santalinus* Linné) の幹枝から得られたサンタリンを主成分とするものと定義されている。確認試験には色価と極大吸収部の記述があるのみで、明確な成分は記載されていない。シタン色素の成分規格の検討を行うにあたって確認試験を実施した結果、水酸化ナトリウム溶液、硫酸第二鉄溶液による色の変化および極大吸収部は、規格基準と一致した。本研究ではHPLCを用いて主成分の解析を行なった。HPLC分析より検出された2つのピークは、MSによりサンタリンAおよびBであることが推定された。しかし、サンタリンAおよびBの定量用標準品は存在していないため、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いてサンタリンAおよびBの単離精製を行なった結果、高純度の標準品が得られた。今後さらに成分解析を進めていくために、大量精製を行うこととする。

A. 研究目的

シタン色素 (Sandalwood Red) は「第4版 既存添加物自主規格」において、シタン (*Pterocarpus santalinus* Linné) の幹枝から得られたサンタリンを主成分とするものと定義されている。¹⁾ シタンは樹木の芯材が赤紫褐色と美しく、とても固い木であり、お餅の着色や染料、楽器に用いられている。シタンにはフラボノイド、テルペノイド、フェノール化合物、サポニンなどの成分が含まれていると言われている。また、シタン色素の主成分であるサンタリン A (SA) およびサンタリン B (SB) は、抗糖尿病作用、抗酸化作用や肝臓保護作用が報告されている。そしてインドでは、皮膚疾患、黄疽、創傷治癒の外用薬として用いられていたことも報告されている。²⁾ また、人工皮膚の着色の技術も開発されている。³⁾

現在のシタン色素の確認試験では、色価や極大吸収波長により評価されている。しかしながら、主成分である SA および SB の定量用標準品が存在しておらず、入手不可能であるため、SA および SB の定量分析は困難である。そこで本研究では、色素中成分の単離精製が可能である、高速向流クロマトグラフィーを用いてシタン色素から SA および SB を単離精製することとした。高速向流クロマトグラフィー (High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) は固体充填剤を用いずに、液-液分配の原理に基づき化合物を単離精製する手法である。本手法は固定充填材との相互作用を受けずに全ての成分を獲得することができるという利点がある。ゆえに、HSCCC を用いてシタン色素の主成分の評価を行い、規格検討をすることとした。

B. 研究方法

シタン色素は、ジーエスインターナショナル

社製(粉末)と三栄源エフエフアイ社製(液体)を用いた。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

HPLC 装置：日立ハイテクサイエンス社製

Chromaster 5160 / 5280 / 5310 / 5430

MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge), GL サイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

確認試験 (第 4 版既存添加物自主規格)¹⁾

- (1) 本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.05 g に相当する量を取り、水 100 mL を加えてかき混ぜるとき、液は混濁する。この液に水酸化ナトリウム (1→25) を加えてアルカリ性にするとき、紫赤色の澄明液となる。
- (2) 本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.1 g に相当する量を取り、80 vol%エタノール 100 mL に溶かし、硫酸第二鉄溶液 (1→10) 1 mL を加えるとき、暗赤褐色に変わる。
- (3) 本品に 80 vol%エタノールを加えて溶かした液は、波長 465~480 nm および 500~515 nm に極大吸収部がある。

シタン色素の LC 分離分析：対象試料はメタノールで調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1%ギ酸メタノール (B) を使用し、A/B : 45 /55 をアイソクラティック条件により、30 分間の分析を行った。

カラム：X Bridge C18 (5 μm, 4.6×150 mm, Waters 社製)

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-510 nm (定量：500 nm, 480 nm)

注入量：10 μL

移動相：0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1%ギ酸メタノール (B)

アイソクラティック条件：A/B : 45 /55 (0 min) →45/55 (20 min) →5/95 (20.1 min) →5/95 (25 min) →45/55 (25.1 min) →45/55 (30 min)

MS 装置：測定条件は、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI：ポジティブモード) で行った。

Capillary voltage : 2.0 kV

Extractor voltage : 3 V

RF lens voltage : 2.5 V

Source temperature : 150°C

Desolvation temperature : 400°C

MS scan ranges : 100-800

シタン色素の HSCCC の分離：対象試料にはジーエスインターナショナル社製を用い、上層および下層混合溶液 (50/50, V/V) に溶解した。二相溶媒系は、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水溶液 (3/5/3/5, V/V/V/V) を用いた。分離部は、Type-J コイルを用い、遠心スピードを 1000 rpm とした。また、コイル容量は、75 mL であり、固定相には、上層を充填した。移動相には下層を用い、流速 1.0 mL/min で送液した。

C. 研究結果

シタン色素はジーエスインターナショナル社製と三栄源エフエフアイ社製の試料を用い、第 4 版既存添加物自主規格の確認試験を実施した。その結果、どちらも規格基準に従うことが確認できた。

(1) 混濁していた水溶液は、アルカリ性にすることによって紫赤色の澄明液となった (図 2)。

(2) 暗赤褐色への変化が確認された (図 3).
(3) 波長 473 nm および 504nm に極大吸収部が確認された (図 4).

始めに、溶解性の検討を行った。水、アセトン、アセトニトリル、エタノールおよびメタノールを用いてシタン色素を溶解した結果、水のみ不溶解であった (図 5)。最も溶解したメタノールを溶解液として用いることとした。

次に、シタン色素の HPLC 分離分析について検討した。まずは、ODS カラムの検討を行った。同じ粒径や長さである東ソー社製の TSKgel ODS-100V と TSKgel ODS-100Z、Waters 社製の X Bridge C18 を用いて、分離やピーク形状を比較した。その結果の HPLC クロマトグラムを図 6 に示した。ゆえに、保持時間やピーク形状が良好な X Bridge C18 を用いることとした。

次いで、移動相条件を検討した。0.1% ギ酸水溶液 / 0.1% ギ酸メタノール = 45/55, 50/50, 40/60 の 3 種類検討を行い、0.1% ギ酸水溶液 / 0.1% ギ酸メタノール = 45/55 を採用することとした。その結果、SA は 6.5~6.6 分、SB は 9.6~9.7 分に検出することができた (図 7)。さらに、図 8 の MS スペクトルおよび MS クロマトグラムにより、いずれも色素成分の推定をすることができた。

HPLC により SA および SB の分配係数と分離係数をそれぞれ算出し、最適な二相溶媒系を検討した。その結果を表 1 に示す。これより、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水溶液 (3/5/3/5, V/V/V/V) を採用した。分配係数の値が 1 より大きいものは分析時間が長くなるため除外し、

その中で分離係数の値が大きいものを選択した。

シタン色素の HSCCC による単離を実施した。なお、固定相の保持率は 53 % であり、分析時間は 150 分であった。HSCCC クロマトグラム (図 9) より、明確な 3 つのピークが検出された。また 270 mg のシタン色素から、SA 1.3 mg (Fr. 2) および SB 0.3 mg (Fr. 3) を単離精製することができた。そして HPLC で純度評価した結果、高純度の SA および SB であることが確認できた。しかし、それらよりもピーク強度が大きく最も濃い赤色であった未知ピーク (Fr. 1) が観察された。それらも赤色素成分であるため、主成分の 1 つであると考えられる。

D. 考察

本研究では、シタン色素 (Sandalwood Red) の規格検討のために成分解析を行なった。まず、第 4 版既存添加物自主規格の確認試験においては、規格内であることが確認できた。次に、シタン色素の色素成分の評価を HPLC により実施した。その結果、いくつかのピークが観察された。また、MS 分析により、SA および SB のピークを推定することができた。しかし、シタン色素の主成分を同定するために HSCCC による色素成分の分離および単離を検討した。その結果、未知の色素成分、SA および SB を単離することができた。しかし、主色素成分と考えられる単離精製されたものの同定はできなかった。今後、本成分の詳細な分離分析や解析を進める必要あると考えられる。

E. 結論

本結果より、既存添加物シタン色素の主成分

は SA および SB であるが, HPLC では検出されない他の赤色素成分の存在も確認できた. ゆえに, HPLC および HSCCC を用いて, シタン色素の主成分の再解析が必要であると考えられる.

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願, 登録状況

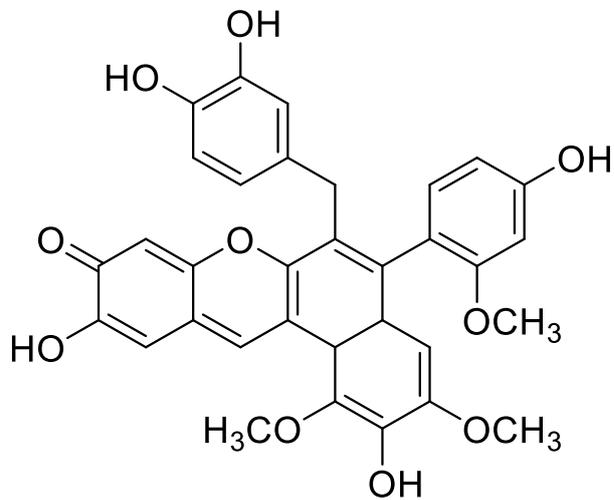
特になし

H. 健康危機情報

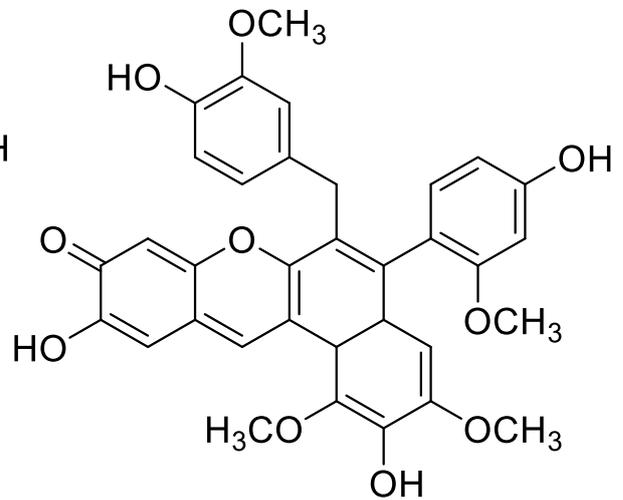
特になし

I. 参考文献

- 1) 日本食品添加物協会 ; 第 4 版 既存添加物自主規格 平成 20 年 10 月 13 日発行
- 2) Bulle S, Reddyvari H, Nallanchakravarthula V, Vaddi DR. ; Therapeutic Potential of Pterocarpus santalinus L. : An Update. Pharmacognosy Review, 43-9 (2016)
- 3) ロレアル. ダルマントン, パトリック. 皮膚の人工的着色のためのサンタリン又はサンタルピンを含有する組成物. 特表 2000-513015. 2000-10-03

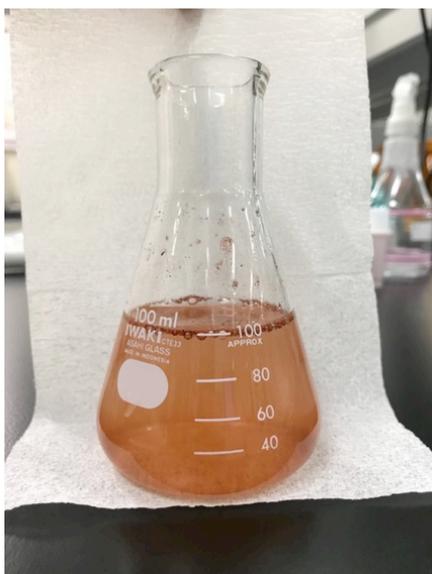


サンタリンA
(Santalin A, SA)
M.W. 582

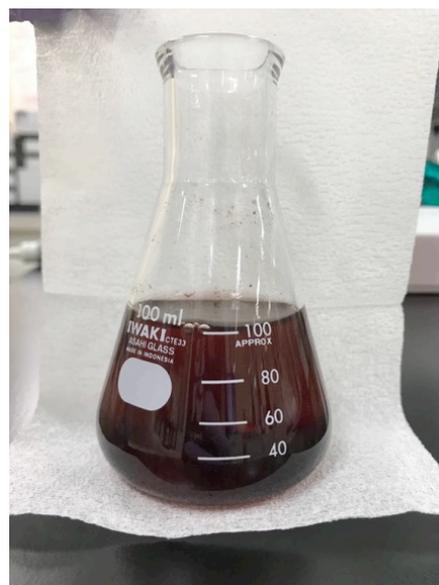


サンタリンB
(Santalin B, SB)
M.W. 596

図1 サンタリン類の化学構造式



NaOH添加前

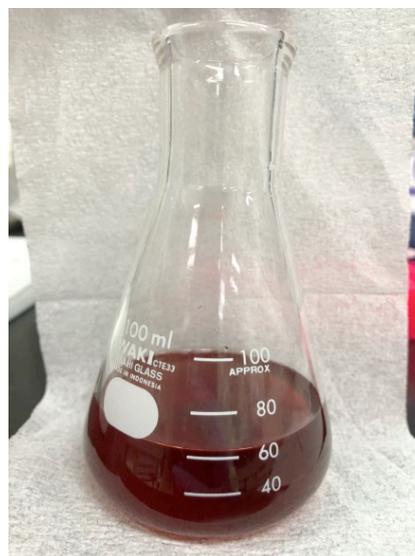


NaOH添加後

図2 シタン色素の確認試験 (1)



硫酸第二鉄添加前



硫酸第二鉄添加後

図3 シタン色素の確認試験 (2)

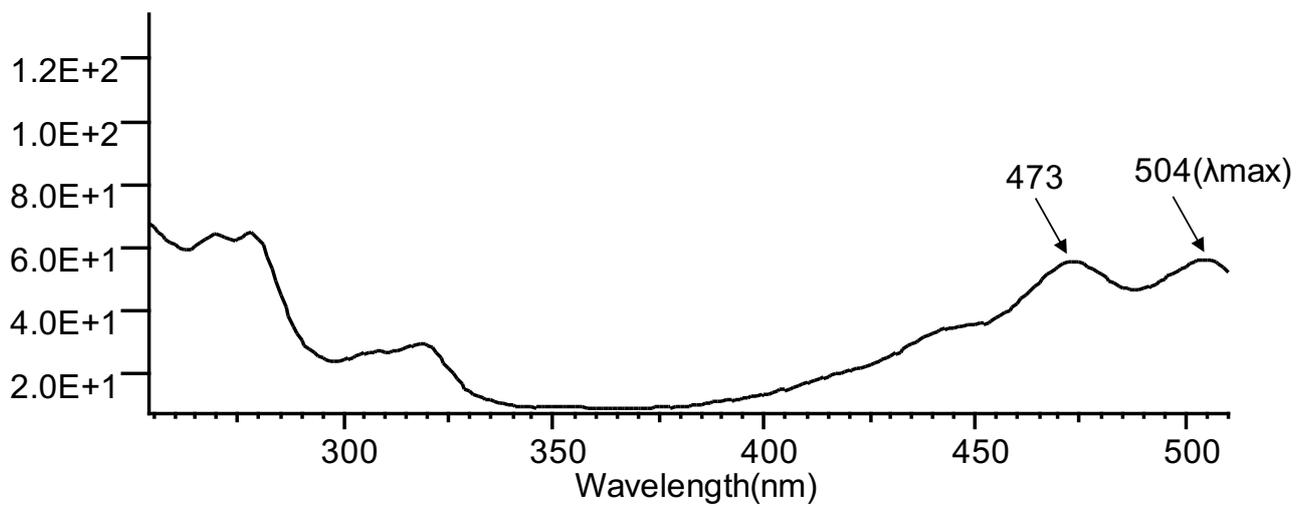


図4 シタン色素の紫外可視吸収スペクトル

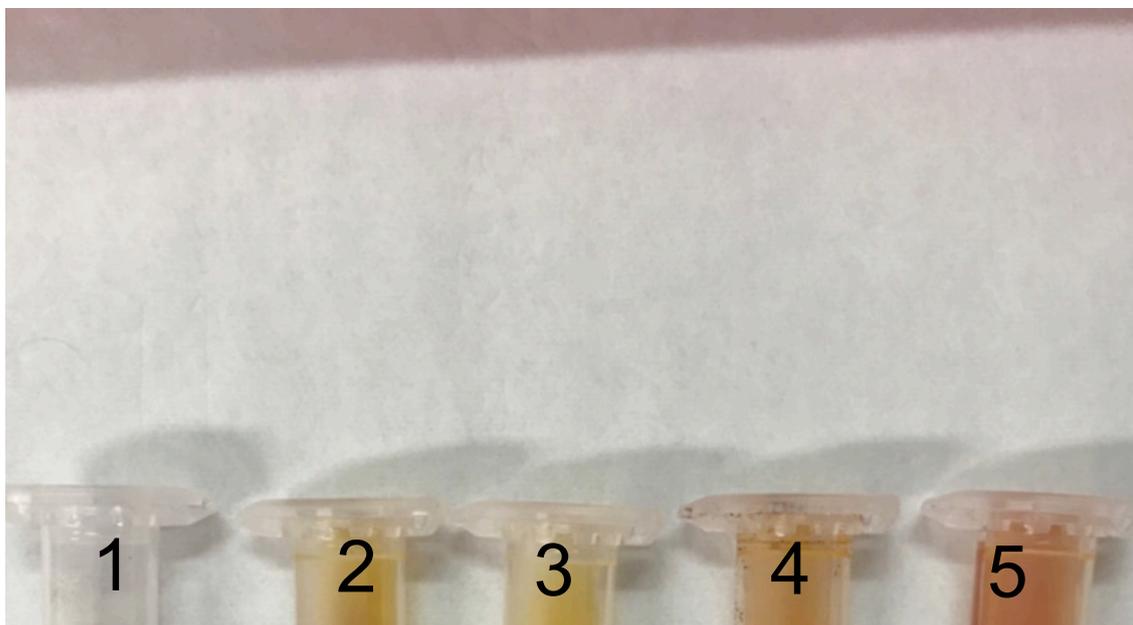


図5 溶解性の検討結果

(1 : 水 2 : アセトン 3 : アセトニトリル 4 : エタノール 5 : メタノール)

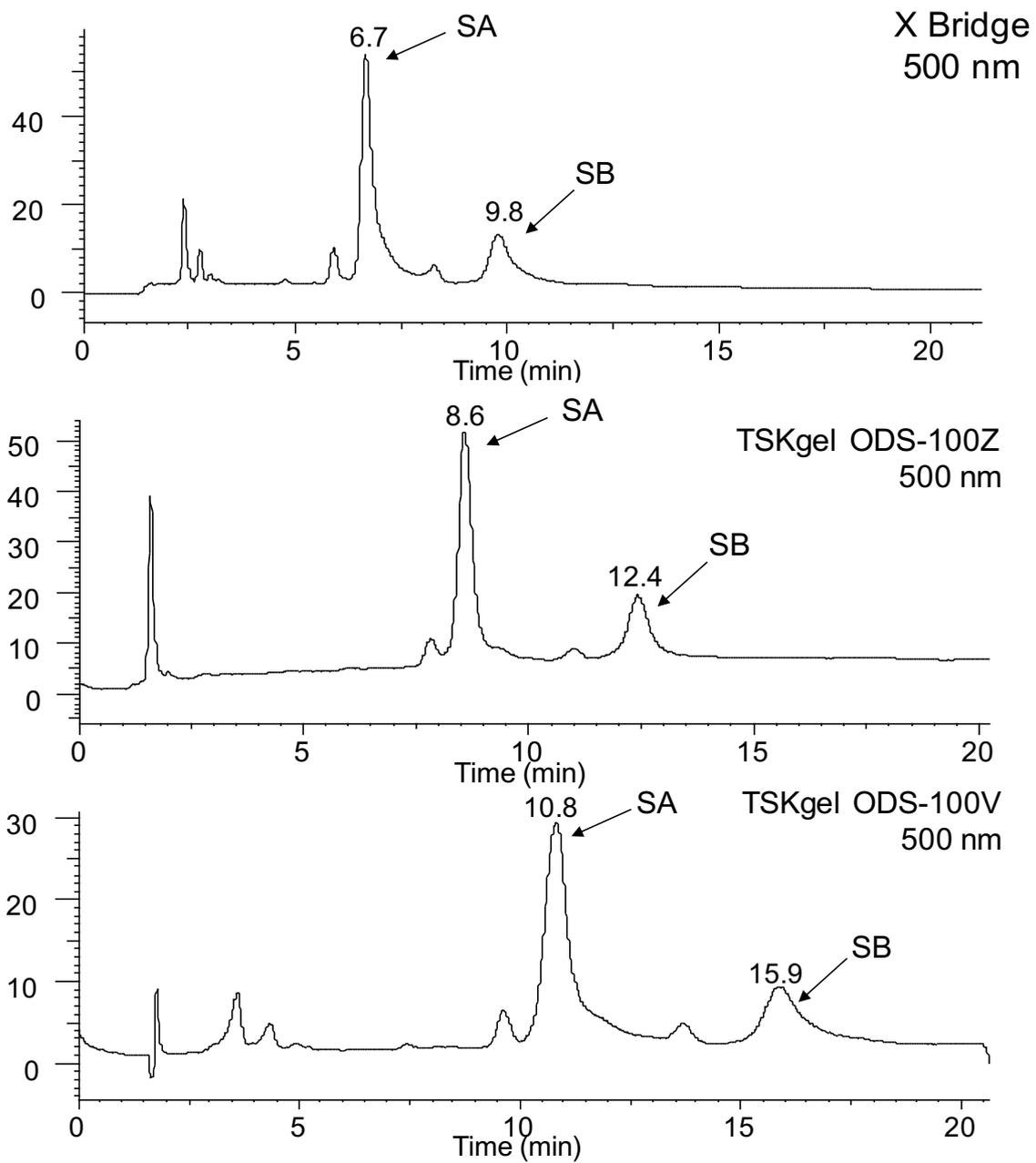


図 6 シタン色素のカラム検討

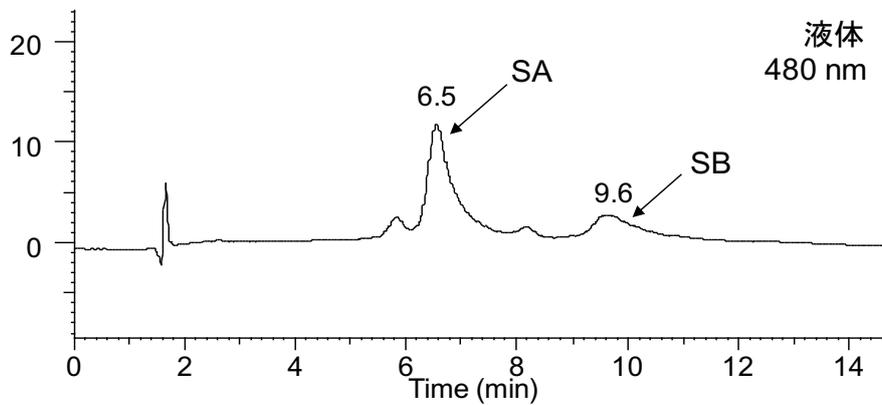
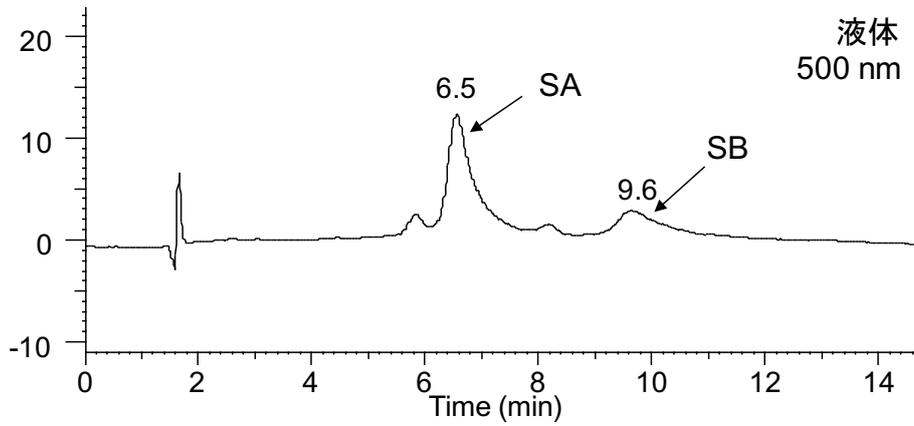
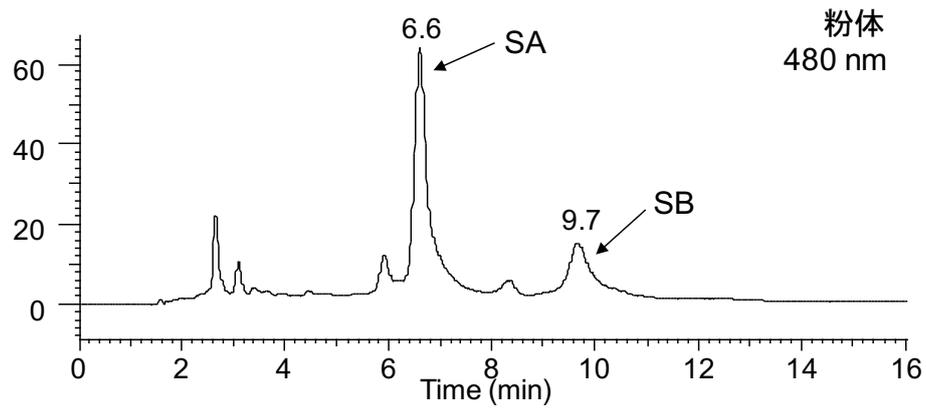
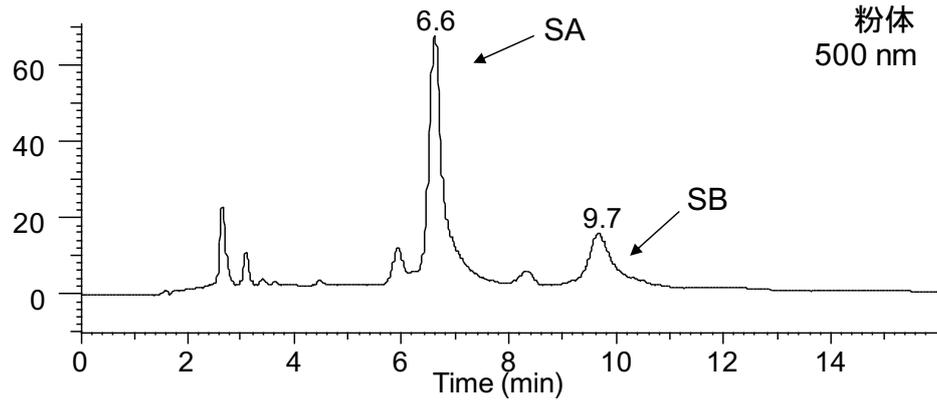


図7 シタン色素の HPLC クロマトグラム

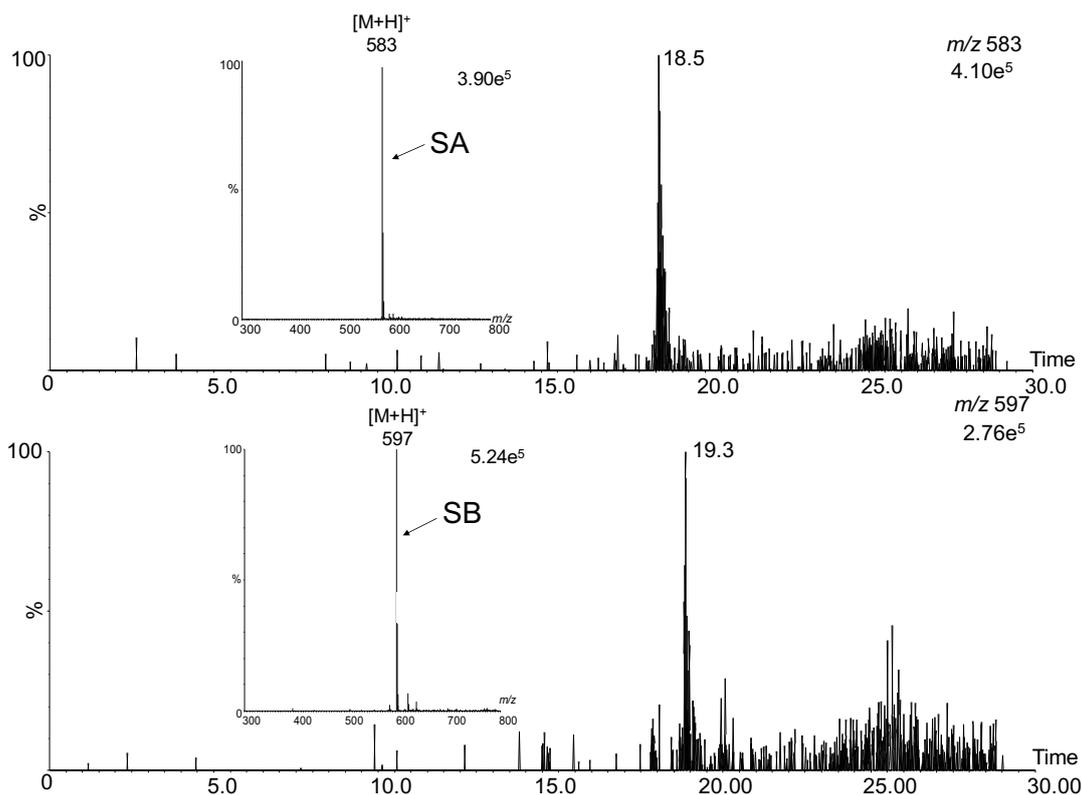


図 8 シタン色素の MS スペクトルおよび MS クロマトグラム

表 1 サンタリン A およびサンタリン B の分配係数

ヘキサン/酢酸エチル /メタノール/水溶液	santalin A 分配係数(K)±SD	santalin B 分配係数(K)±SD	分離係数(α) ±SD
2/5/2/5	2.17 ± 0.4	4.73 ± 1.3	2.16 ± 0.2
2/5/3/5	0.62 ± 0.0	0.75 ± 0.1	1.25 ± 0.0
3/5/2/5	0.95 ± 0.1	1.42 ± 0.4	1.49 ± 0.4
3/5/3/5	0.35 ± 0.0	0.59 ± 0.1	1.68 ± 0.2

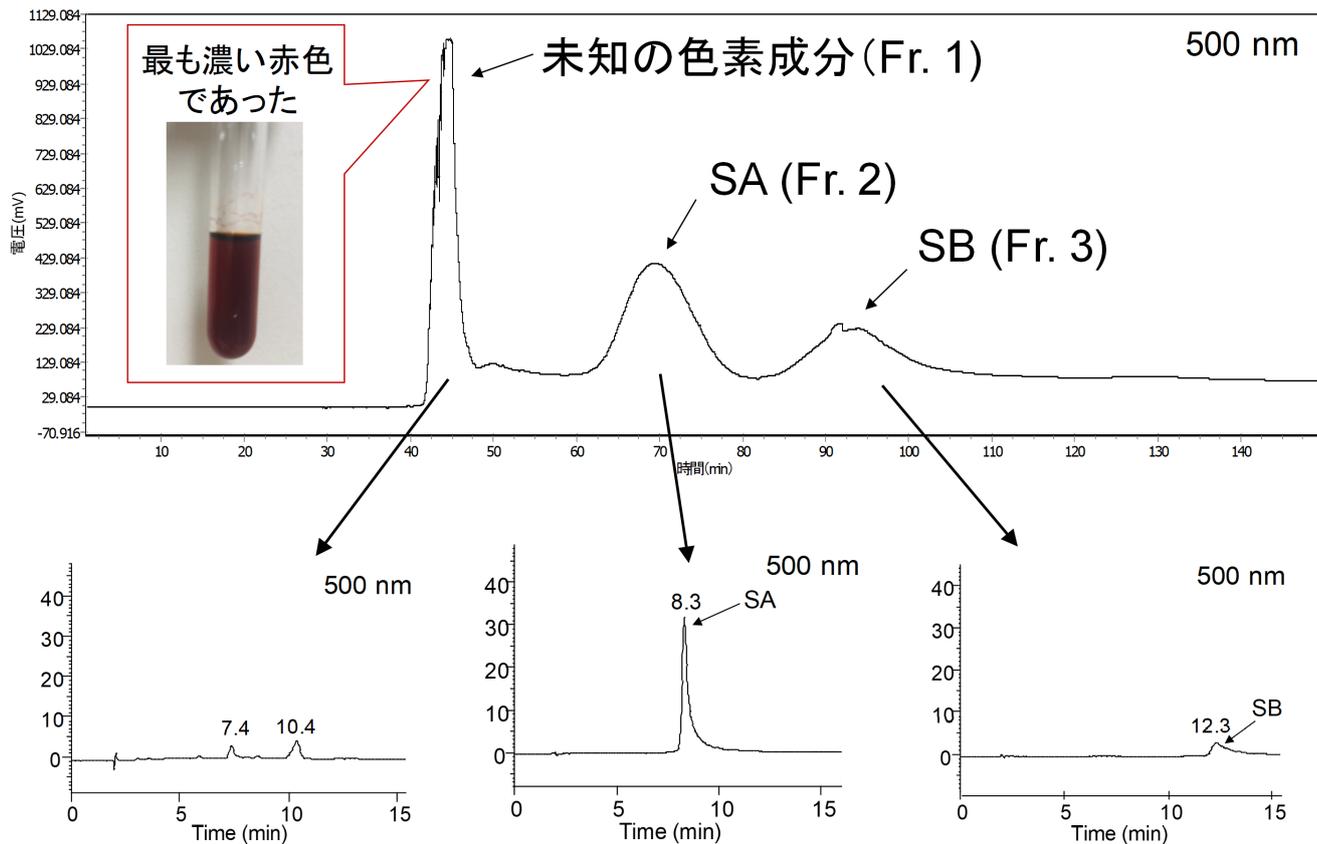


図9 シタン色素の HSCCC クロマトグラム (上) と HPLC クロマトグラム (下)