

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29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 既存添加物名簿に記載されているレイシ抽出物、カキ色素、ルチン（抽出物）の品質規格作成のための化学的検討として、主に製品中の含有成分について精査した。各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製及び標品との直接比較により、レイシ抽出物から7種の化合物を同定し、薄層クロマトグラフィー（TLC）分析の指標候補成分を見出した。カキ色素については、含有成分について分析した結果、単一の化合物は得られなかった。既存添加物名簿に記載されているフラボノイドや、含有が示唆される縮合型タンニンについては、それらの定性試験を実施したが呈色反応は認められなかった。それゆえ、カキ色素の本質はフラボノイドではなく、他の化合物であることが示唆された。ルチンについては、原料の一つとなるカイカ（エンジュのつぼみ）由来の成分を明らかにするため、50%エタノール抽出物から16種の化合物を単離、同定した。

研究協力者

好村守生 松山大学薬学部 准教授

A. 研究目的

既存添加物の多くは植物を原料とする抽出物であり、多種多様の成分が含まれているため、その品質管理には詳細な成分解析に基づいた品質規格作成が必要とされる。一方で、原料が天然物であるため、製品の製法や成分組成が不明瞭なものが多く、成分規格の整備が遅れているものがある。本研究では、成分規格が設定されていないレイシ抽出物、カキ色素について、品質規格作成のための基礎的データの集積を目的に、既存添加物製品中の含有成分の構造解析を行った。また、ルチン（抽出物）については「アズキの全草、エンジュのつぼみ若しくは花又はソバの全草から得られた、ルチンを主成分とするものをいう」と既存添加物名簿で定義されていることから、原料の成分比較となるデータ作成のための検討として、エンジュのつぼみ（カイカ）の成分精査を行った。

B. 研究方法

レイシ抽出物、カキ色素の添加物製品及びル

チン（抽出物）の原料となるカイカ（エンジュのつぼみ）について、それぞれ各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、化合物の単離を行った。単離した各化合物については各種機器分析データに基づく構造解析、標品との直接比較等により化合物の構造解析を行った。また、カキ色素についてはマグネシウム-塩酸反応（フラボノイドの定性試験）及び*n*-ブタノール-塩酸反応（縮合型タンニンの定性試験）を行った。

C. 結果及び考察

C-1) レイシ抽出物

レイシ抽出物について、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）による分析を行った結果、逆相 HPLC 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 分析条件について、展開溶媒を検討した結果、酢酸エチル（EtOAc）/メタノール（MeOH）/水（H₂O）/ギ酸（HCOOH）（20:2:1:0.01）で展開し、UV（254 nm）照射することで *R_f* 値 0.6 付近に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。レイシ抽出物を MeOH、アセトン、エタノール

(EtOH), H₂O, EtOAc 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. 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.

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 分析における指標成分の候補として, 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, 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.

C-2) カキ色素

カキ色素について, カラムクロマトグラフィーによる分離, 精製を繰り返し実施したが, いずれの充填剤を用いても, 単一の化合物は得られなかった. 一方, 分離したフラクションからカキ色素には *trans-p-coumaric acid* が含まれることが示唆され, HPLC による標品との比較から同化合物の存在を明らかにした.

カキの果実には縮合型タンニンやフラボノイドの含有が知られているため, 本色素の構成成分としてそれらの存在を確認する目的で, カキ色素自体の NMR 測定を行った. ¹H-NMR を測定した結果, 供試したカキ色素には縮合型タンニンに特徴的な A 環及び B 環に由来する芳香族領域 (約 6~8 ppm) のブロードなシグナルが観察されなかった. さらに ¹³C-NMR を測定した結果, 縮合型タンニンに特徴的なシグナルは観察されなかった. よって, 供試したカキ色素に縮合型タンニンは主に含有していないことが示唆された. そこで, 本製品について *n*-ブタ

ノール-塩酸反応, マグネシウム-塩酸反応を試験した結果, いずれも呈色は観察されなかった. それゆえ, カキ色素の本質は既存添加物名簿に記載されているフラボノイドではなく, 別の化合物であることが示唆された.

C-3) ルチン (抽出物)

ルチン (抽出物) の原料となるカイカの 50%EtOH 抽出物及び EtOH 抽出物について, 各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し, 成分精査を行った結果, 16 種の化合物 [rutin, quercetin, gallic acid, protocatechuic acid, maltol, ethylrutinoside, 4-hydroxybenzoic acid, maltol-3-*O*-{4'-*O*-*p*-coumaroyl-6'-*O*-(3-hydroxyl-3-methyl glutaryl)} glucoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, kaempferol, *trans-p*-hydroxycinnamic acid, *cis-p*-hydroxycinnamic acid, *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine, *N,N'*-diferuloylputrescine, *N,N'*-dicoumaroylputrescine, isorhamnetin 3-*O*-rutinoside] を単離, 同定した.

単離した化合物を標品とし, カイカ 50%EtOH 抽出物の HPLC 成分プロファイリングの結果, 主検出成分は rutin であり, その他の化合物はマイナー成分であった. これらのうち, *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine, *N,N'*-diferuloylputrescine, *N,N'*-dicoumaroylputrescine は天然に稀少な化合物であるため, 特徴成分としてこれらを検出することで, その基原がエンジュ由来であることを示す指標となり得る可能性が考察された.

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 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)

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし