

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和6年度研究分担報告書
既存添加物の成分組成に関する研究
～カロブ色素の成分解析～

研究代表者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨

カロブ色素は第 10 版食品添加物公定書に収載されている着色料であるが、確認試験は呈色を確認する定性試験のみであり、本添加物の特徴成分を具体的に確認する試験法の提案がのぞまれる。本研究はカロブ色素の主要成分を解明することで、高度な品質保証のための試験法の提案につなげることを目的に検討を行った。昨年度はカロブ色素製品の HPLC 分析から 4 つの主ピークを検出し、そのうち 2 ピークが 4'-dihydrophaseic acid β -D-glucopyranose ester, schaftoside によることを明らかにしている。今年度はさらに精査を行い、残り 2 ピークが schaftoside 配糖体であることを明らかにした。4 ピークのうち、3 ピークが schaftoside 類であることから、HPLC 分析における指標成分候補として schaftoside が考察された。そこで定量分析として schaftoside を直接分析する方法と、schaftoside 配糖体を酵素分解により schaftoside に誘導して分析する方法を検討し、いずれにおいても定量値を算出することができた。一方で、schaftoside について TLC 分析による確認試験を検討した結果、水または 50%メタノールを抽出溶媒として調製した試料溶液をシリカゲル板にスポットし、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV (254 nm)照射することで、 R_f 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認することができ、分析可能であることが示唆された。

研究協力者

好村守生 松山大学薬学部

内倉 崇 松山大学薬学部

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

マメの胚乳部は多糖類を豊富に含んでおり、カロブビーンガムとしてガムベースにも利用されている。

食品添加物公定書におけるカロブ色素の確認試験は、色価を換算して調製した試験液の呈色を主とする定性試験であり、具体的な特徴成分の確認は規定されていない。成分はフラボノイドとされており、これまで LC/TOF-MS 分析及び成分の変換反応に基づき、主要成分としてフラボノイド(apigenin)C-配糖体(isoschaftoside, schaftoside, neoschaftoside)が明らかにされ、 ^1H -qNMR で純度検定した apigenin 標品の絶対検量線を作成して UPLC で定量分析する結果が報告されている。²⁾

本研究では、カロブ色素の HPLC における主検出成分を解明し、確認試験に適用できる含有成分の提案を目的に検討を行った。

A. 研究目的

カロブ色素は第 10 版食品添加物公定書¹⁾に収載され、「イナゴマメ(*Ceratonia siliqua* L.)の種子の胚芽を粉砕して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある」と定義される着色料である。性状は、「淡黄～淡黄褐色の粉末又は粒で、わずかに特異なにおいがある」とされ、主成分はフラボノイドで、かん水を含む弱アルカリ性の麺類に添加すると黄色を呈することが知られている。イナゴ

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

カロブ色素製品として、市場に流通しているカロブ色素(管理番号 C2250)を用いた。IsoschaftosideはAdooq Bioscience製, schaftosideはCAYMAN CHEMICAL COMPANY製を用いた。Rutinは東京化成製を使用した。分離、精製にはカラム充填剤として YMC GEL ODS-AQ(AQ12S50)(ワイエムシイ製), Chromatorex ODS(富士シリシア製), Diaion HP-20(三菱化学製)を用いた。 β -グルコシダーゼ(from almond, 4 U/mg)は、シグマアルドリッチジャパンより入手した。TLCはTLC Silica gel 60 F₂₅₄(Merck)を用いた。NMR 溶媒(MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆)はEurisotop製を用いた。その他の試薬は、特級または高速液体クロマトグラフ用を用いた。

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。測定条件を以下に示す。(条件 1)カラム : L-column ODS(2.1 I.D. × 150 mm)(化学物質評価研究機構製), カラム温度 : 40℃, 流速 : 0.3 mL/min, 測定波長 : 200–400 nm, 移動相 : (A) 0.1%ギ酸 in 蒸留水及び (B) 0.1%ギ酸 in 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%)]. (条件 2)カラム : L-column ODS (2.1 I.D. × 150mm, 5 μ m)(化学物質評価研究機構), カラム温度 : 40℃, 流速 : 0.2 mL/min, 測定波長 : UV 280 nm, 移動相 : 0.01 mol/L リン酸 : 0.01 mol/L リン酸二水素カリウム : アセトニトリル(42.5:42.5:15). NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製)(¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz)を使用した。ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [MeOH-*d*₄ (¹H: 3.31 ppm, ¹³C: 49.0 ppm), DMSO-*d*₆ (¹H: 2.50 ppm, ¹³C: 39.52 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, 測定溶媒にはアセトニトリルまたはメタノール (MeOH)を用いた。

B-3) 分画物の調製

カロブ色素(10 g)に水を加え, Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し, H₂O, 10%MeOH~MeOH で順次溶出し, 7 分画物を得た(① H₂O 溶出画分 6.3 g, ② 10%MeOH 溶出画分 189 mg, ③ 20%MeOH 溶出画分 37.8 mg, ④ 30%MeOH 溶出画分 56.1 mg, ⑤ 40%MeOH 溶出画分 83.5 mg, ⑥ 50%MeOH 溶出画分 30.4 mg, ⑦ MeOH 溶出画分 65.6 mg)。

B-4) 化合物の単離

カロブ色素について, Diaion HP-20, YMC GEL ODS-AQ 等による分離, 精製を繰り返し, 化合物の単離を試みた。単離した化合物については HPLC における標品との直接比較, あるいは文献値と NMR データ等の比較によって同定した。

B-5) 確認試験の追試

カロブ色素製品について, 食品添加物公定書に記載されている確認試験(1. 本品の表示量から, 色価 30 に換算して 0.5g に相当する量を取り 70%MeOH 50 mL を加えて振った時に液の色が淡黄~黄色になる。2. 1 の上澄み液に水酸化ナトリウム溶液 (1→20) を加えてアルカリ性にするとき, 液の色は濃黄色になる。3. 1 の上澄み液に塩酸 (1→3) を加えて酸性にするとき, 液の色はほとんど消える。1 の上澄み液 5 mL に塩化鉄(III)六水和物溶液 (1→10) 1 mL を加えるとき, 液の色は黄褐色に変わる。5. 本品の表示量から色価 30 に換算して 0.1 g に相当する量を量り, 水酸化ナトリウム溶液(1→1250)100 mL 加えた後, 定量分析用ろ紙(5 種 C)でろ過した液は, 波長 385~400 nm に吸収極大がある)を行った。比較試料として, フラボノイド配糖体のルチンを用いた。

B-6) 定量分析

カロブ色素製品(100 mg)に 0.1 mol/L 酢酸緩衝液(pH 5.0)(10 mL)を加え, 20 分間超音波処理を行った。遠心分離後, 残渣に 0.1 mol/L 酢酸緩衝液(pH 5.0)(10 mL)を加え, 20 分間超音波処理

を行い、遠心分離を行った。得られた上澄液を酢酸緩衝液で 20 mL に定容し、さらに酢酸緩衝液(1 mL)を加え、試料溶液(酵素処理なし)とした。同様の操作により得られた上澄液について、37℃で 5 分間加温した後、 β -グルコシダーゼ/酢酸緩衝液(160 U)(1 mL)を加え、さらに 37℃で 30 分間加温したものを試料溶液(酵素処理あり)とした。

B-7) TLC 分析

カロブ色素製品(100 mg)を各種溶媒(H_2O , 10%MeOH $\sim$ MeOH)(10 mL)中で 20 分間超音波処理し、遠心分離後、上澄液を試料溶液とした。展開溶媒は *n*-ブタノール/酢酸/水(4: 1: 2)を用い、スポット量を 3 μL 、検出は UV 照射(254 nm)で行った。

C. 結果及び考察

C-1) 公定書における確認試験の追試

食品添加物公定書におけるカロブ色素の確認試験について、フラボノイドのルチンを比較試料として用い、改めて試験を実施した。確認試験 1 $\sim$ 5 の項目について試験した結果、いずれも同様の呈色、波長を示し(図 1)、呈色による確認は曖昧さがあり、カロブ色素に特徴的な指標成分候補を明らかにし、それに基づく試験法の提案の必要性が示唆された。

C-2) 化合物の分離精製

HPLC 分析結果より、ほぼ単一なピークとして確認されたカロブ色素 Diaion HP-20 H_2O 溶出部(①)について、YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィーによる分離精製を行い、これまでピーク 1 が 4'-dihydrophaseic acid β -D-glucopyranose ester であることを同定している。また、HPLC 分析による標品との比較検討で、ピーク 4 が schaftoside、ピーク 4 の後ろにあるマイナーピークが isoschaftoside であると同定している。今年度はピーク 2 $\sim$ 4 を含む Diaion HP-20 20%MeOH 溶出部(③)及び 40%MeOH 溶出部(⑤)について、さらに ODS カラム(YMC GEL ODS-AQ, CHROMATOREX ODS)による分離精製を行い、ピーク 2, 3 を schaftoside glucoside

として、ピーク 4 として schaftoside として単離した。Schaftoside glucoside の glucose の結合位置は、現在検討中である。このように、主検出成分として schaftoside 及びその配糖体であることが確認され、指標成分候補として schaftoside が考察された(図 2)。

C-3) 酵素分解

HPLC 分析結果より、主検出成分として schaftoside とその配糖体が同定された。そこで、本添加物について β -グルコシダーゼによる酵素分解を試みた。その結果、酵素処理により schaftoside に分解することが確認され、HPLC 分析(条件 1)においては、ピーク 2 及び 3 が消失し、ピーク 4 に収束することが観察された(図 3)。

C-4) 定量分析

カロブ色素製品中の指標成分候補として schaftoside が示された。そこで、本添加物中の schaftoside 量について、HPLC による定量分析法について検討した。カロブ色素製品 100 mg を正確にはかり、0.1 mol/L 酢酸緩衝液で抽出して遠心分離後、その上澄液を試料溶液とした。HPLC 分析は、ODS カラムを用い、リン酸緩衝液/アセトニトリル系溶媒を移動相に用い、アイソクラティック溶出による分析条件(条件 2)を設定した。その結果、保持時間 7 分付近に schaftoside のピークを検出することができ、分析可能であることが示された。本方法を適用し、絶対検量線法により定量分析した結果、schaftoside 量を 5.0 mg/g と定量値を算出することができた。

本添加物には schaftoside glucoside の含有も認められ、 β -グルコシダーゼにより酵素分解され schaftoside に収束することを確認している。そこで、 β -グルコシダーゼにより酵素処理して schaftoside に収束させ、定量分析する方法も検討した。その結果、schaftoside の定量値 8.6 mg/g を算出することができ、酵素処理による方法も分析可能であることが示唆された(図 4)。

C-5) TLC 分析

指標成分候補とした schaftoside について、TLC 分析による確認試験法を検討した。まず、schaftoside の検出について検討した結果、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV(254 nm) 照射することで、 R_f 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認することができた。次に抽出溶媒を検討する目的で、 H_2O 及び含水 MeOH(10%~90%)、MeOH で抽出した試料溶液について、注入量を一定にして HPLC 分析を行い、schaftoside のピーク面積を比較した。その結果、90%MeOH 及び MeOH で調製した試料溶液はピーク面積が小さく、それ以外(H_2O ~80%MeOH)については、ピーク面積はほぼ同等であった。そこで、 H_2O 、50%MeOH を抽出溶媒として調製した試料溶液について、TLC 分析した結果、いずれも schaftoside のスポットを確認することができた(図 5)。

D. 結論

食品添加物カロブ色素の成分精査を行った結果、5 つの化合物〔dihydrophaseic acid β -D-glucoside, 2 種の schaftoside 配糖体, schaftoside, isoschaftoside〕を単離し、HPLC 分析における指標成分候補として schaftoside が確認された。

分析検討の過程で、含有成分として複数の schaftoside 配糖体の含有が認められた。これら配糖体は天然物である原料によって含有量にばらつきが生じることも考察されたため、定量分析として、schaftoside を直接分析する方法と、酵素分解により schaftoside に誘導して分析する方法を検討し、いずれにおいても定量値を算出することができた。指標成分候補とした schaftoside について、TLC 分析による確認試験を検討した結果、水または 50%メタノールを抽出溶媒として調製した試料溶液をシリカゲル板にスポットし、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV(254 nm)照射することで、 R_f 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認することができ、分析可能であることが示唆された。

E. 参考文献

1) 第 10 版食品添加物公定書，2024 年。

2) 第 105 回日本食品衛生学会学術講演会要旨集，2013 年 5 月(東京)。

F. 研究業績

1. 学会発表等

1) 鬼嶋七海，内倉崇，好村守生，阿部裕，杉本直樹：食品添加物カロブ色素の成分研究，第63回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (2024.11)。

2. 論文発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

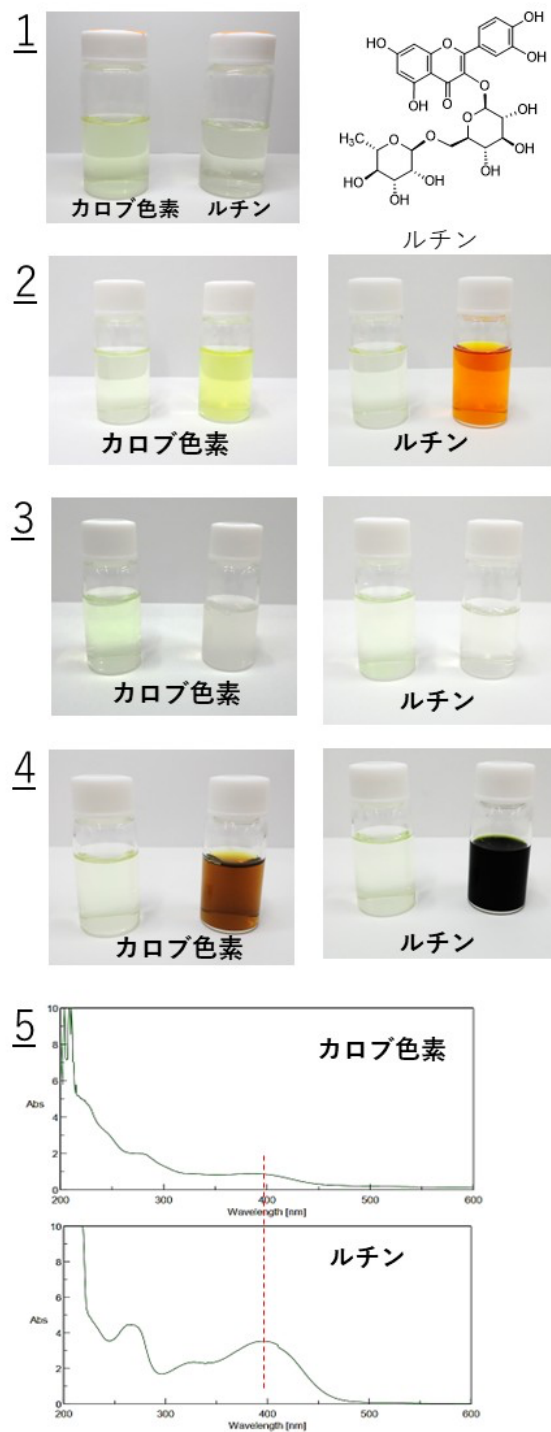


図 1. 公定法における確認試験 1～5

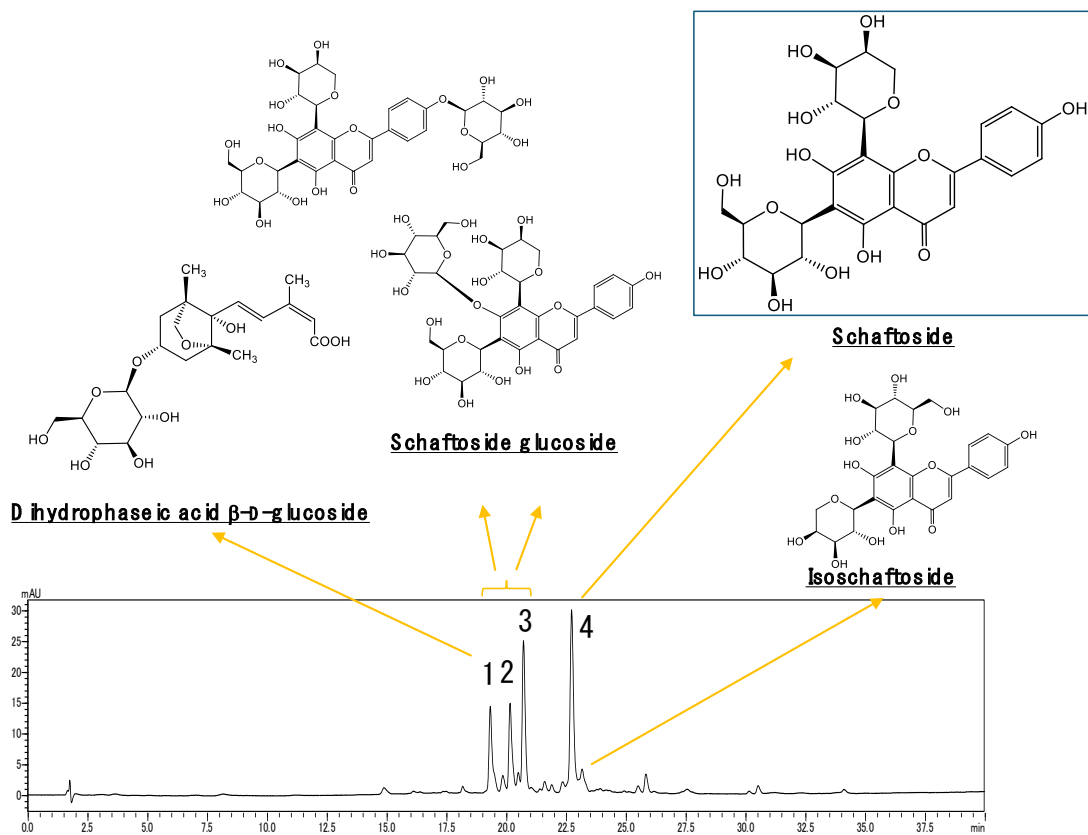
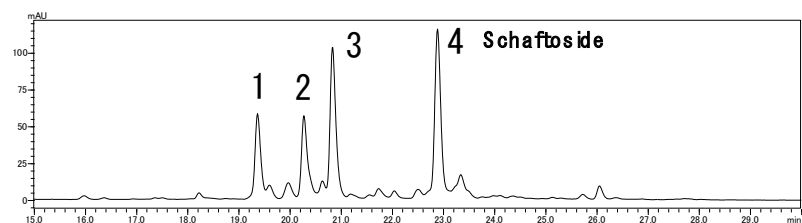
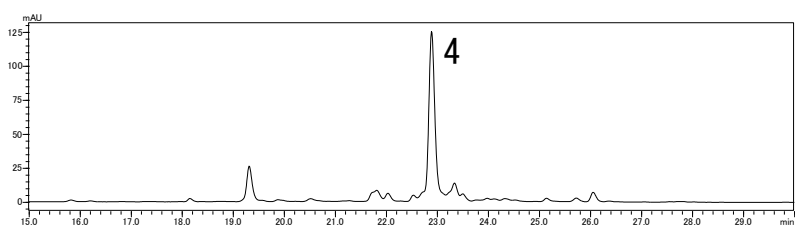


図 2. カロブ色素の HPLC クロマトグラム (条件 1)

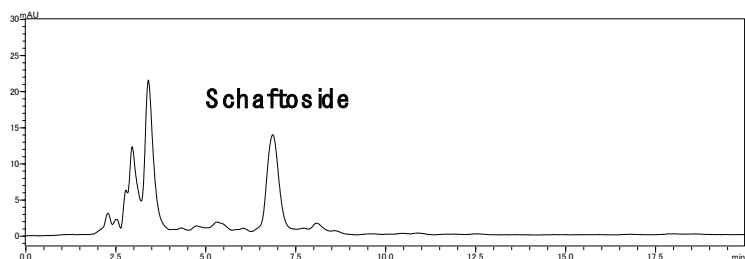
(条件1)



↓ β -glucosidase



(条件2)



↓ β -glucosidase

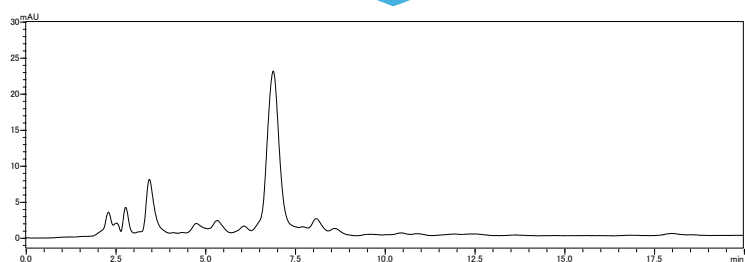
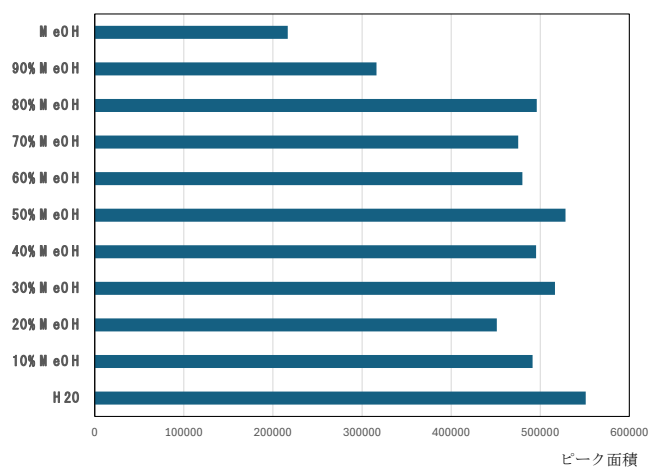
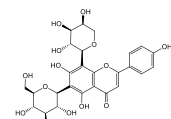


図 3. 酵素分解の HPLC クロマトグラム

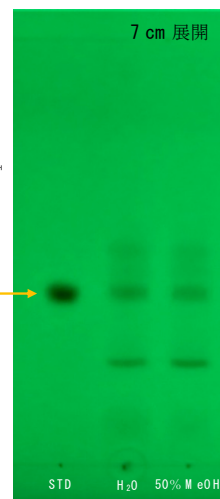
抽出溶媒の検討



TLC 分析



Schaftoside



担体 :TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)
 展開溶媒 *n*-BuOH:CH₃COOH:H₂O (4:1:2)
 スポット量 3 μ L
 検出 UV 照射 254 nm)

図 4. TLC 分析