

**研究要旨** 1) ショウガ抽出物について、添加物12製品のHPLCによる成分比較を行った結果、ピークパターンから3グループ（①[6]-gingerolが主検出，②[6]-gingerol及び[6]-shogaolいずれも検出，③いずれも検出せず）に分類されることが明らかとなった。製品用途からみると，①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物，②はショウガ抽出物，③は香辛料抽出物で，用途により成分分布が異なることが確認された。それゆえ，ショウガ抽出物を用途とする場合，[6]-gingerol及び[6]-shogaolのいずれも又はいずれかを確認することで対応できることが考察された。2) ヒマワリ種子抽出物について，添加物3製品のHPLC分析により主検出される3ピークについて成分精査を行い，モノカフェオイルキナ酸類〔chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid〕とともにcaffeic acidを単離，同定した。また主検出ピーク以外の成分についてさらに成分精査を進め，ジカフェオイルキナ酸類 (3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid) を単離，同定した。さらに文献未記載である2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acidユニットを含むカフェオイルキナ酸2種を単離，構造決定した。単離した化合物について，DPPHラジカル消去活性を評価した結果，いずれも高い活性値を示し，活性への寄与が考察され，モノ及びジカフェオイルキナ酸が有効成分として示唆された。3) キハダ抽出物について，添加物製品のTLC分析を日本薬局方（局方）のオウバクの確認試験を準用して行った結果，オウバクと同様にberberine, palmatineのスポットが観察され，berberineが主検出して認められた。それゆえ，局方と同じTLC試験法で対応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 准教授  
内倉 崇 松山大学薬学部 特任助教  
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 部長  
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 主任研究員  
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 主任研究員

#### A. 研究目的

1) ショウガ抽出物は，既存添加物名簿<sup>1)</sup>に収載され，ショウガの根茎から得られた，ショウガオール及びジンゲロールを主成分とするものをいう。基原・製法・本質は，ショウガ科ショ

ウガ (*Zingiber officinale* ROSC.) の根茎より，室温時エタノール，アセトン又はヘキサンで抽出して得られたものである。主成分はジンゲロール類及びショウガオール類であるとされ，製造用剤を用途とする。基原となるショウガは食品であり，第十八改正日本薬局方（局方）<sup>2)</sup>記載の生薬〔ショウキョウ（生姜），カンキョウ（乾姜）〕の原料でもあり，食品添加物としても含めその用途は広い。一方で，局方には確認試験が規定されているが，本添加物は，日本食品添加物協会発行の第5版既存添加物自主規格<sup>3)</sup>にも収載されておらず，品質管理に向けた科学データの集積が課題とされる。そこで本研究では，本添加物の成分データの集積を目的に，添加物製品間の成分比較について検討を行った。

2) ヒマワリ種子抽出物は、既存添加物名簿に記載され、ヒマワリの種子から得られた、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸を主成分とする。基原・製法・本質は、キク科ヒマワリ (*Helianthus annuus* LINNE) の種子又は種子の搾油相より、熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸であるとされ、酸化防止剤を用途とする。本添加物は、日本食品添加物協会発行の第5版既存添加物自主規格に記載され、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸の定量法が記載されているが、種子中にはネオクロロゲン酸やカフェー酸も含まれるとされ、実データに乏しい。そこで本研究では、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品の成分解析について検討を行った。

3) キハダ抽出物は、既存添加物名簿に記載され、「ミカン科キハダ (*Phellodendron amurense* RUPR) の樹皮より水又はエタノールで抽出して得たものである。主成分はベルベリンである」と定義される苦味料等である。局方には、同じ基原を原料とする生薬オウバクが記載されており、その中で TLC を用いた確認試験が規定されているが、本添加物については成分情報が乏しい。そこで本研究では添加物製品の TLC 分析を行った。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

1) ショウガ抽出物の添加物製品 (1~12) は、日本食品添加物協会を通じて入手した。化合物の同定、成分解析に標品として用いた [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol, [6]-shogaol, [8]-shogaol, zingiberene, citral は、富士フィルム和光純薬株式会社製、フナコシ製、またはコスモバイオ製を用いた。試薬はすべて特級または HPLC 用を用いた。

2) ヒマワリ種子抽出物の添加物製品 [1 (管理番号 A1089), 2 (管理番号 A1090), 3 (管理番号 A2241)] 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 chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid は長良サイエンス株式会社製、

3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid は MedChemExpress 製, caffeic acid は東京化成製を用いた。活性評価については、DPPH Antioxidant Assay Kit (同人化学) を用いて測定した。

3) キハダ抽出物の添加物製品は、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 berberine, palmatine, coptisine, jateorrhizine, magnoflorine は富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。試薬はすべて特級を用いた。

### B-2) 装置及び測定条件

1) ショウガ抽出物: 逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラムに L-column ODS (150 × 2.1 mm i.d., CERI) を使用し、移動相に (A) 0.1% ぎ酸-蒸留水, (B) 0.1 vol% ぎ酸-アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A) : 0→5 min (50→85%), 5→10 min (85%), 10→20 min (85→100%), 20→40 min (100%)] の溶出条件, 流速 0.3 mL/min (40°C), 検出波長 254, 280 nm で測定した。NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒としてメタノール (MeOH) -*d*<sub>4</sub> を用いた。ケミカルシフトは溶媒由来ピーク [MeOH-*d*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H: 3.30 ppm, <sup>13</sup>C: 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。

2) ヒマワリ種子抽出物: 逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラムに L-column ODS (150 × 2.1 mm i.d., CERI) を使用し、移動相に (A) 5% 酢酸, (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A) : 0→30 min (B: 0→50%), 30→35 min (B: 50→85%), 35→40 min (B: 85%), 40→50 min (B: 85→100%)] の溶出条件, 流速 0.3 mL/min (40°C), 検出波長 280 nm で測定した。NMR は Bruker AVANCE500 (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒として MeOH-*d*<sub>4</sub> を用いた。HR-ESI-MS は micrOTOF-Q を使用した。

3) キハダ抽出物: TLC は、HPTLC Silica gel 60F<sub>254</sub> Glass plate (Merck 社製) を用いた。展開溶媒は *n*-ブタノール/酢酸/水 (7:1:2), 注入量は 5 μL

で行った。

### B-3) 試料調製

1) ショウガ抽出物：各試料について、1 mg/mL になるよう MeOH で溶解し、試料溶液とした。調製した各試料溶液について、逆相 HPLC 分析に用いた。ショウガ、ショウキョウ、カンキョウについて、エタノール、アセトン、*n*-ヘキサンエキスを調製し、添加物製品と含有成分の比較検討を行った。ショウガ抽出物 (4.1 g) に水

(50 mL) を加え、*n*-ヘキサン (50 mL×3) で液液分配した。得られた *n*-ヘキサンエキス (1.0 g) を各種カラムクロマトグラフィー (YMC gel ODS-AQ, Chromatorex ODS, 分取 TLC) 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。

2) ヒマワリ種子抽出物：各添加物試料について、10 mg/mL になるよう蒸留水で溶解し、試料溶液とした。調製した各試料溶液について、逆相 HPLC 分析に供した。分離精製は、試料 (100 g) を水に溶解し、Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより分画し、3 画分〔① 水溶出部 (62.5 g), ② 30%MeOH 溶出部 (20.8 g), ③ MeOH 溶出部 (1.4 g)〕を得た。MeOH 溶出部について、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分〔④ 50%MeOH 溶出部 (976.7 mg), ⑤ 80%MeOH 溶出部 (546.4 mg), ⑥ 70% acetone 溶出部 (70.4 mg)〕に分画し、カラムクロマトグラフィーに供した。酸化防止の評価については、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を DPPH Antioxidant Assay Kit を用いて測定した。コントロールの吸光度に対する試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を算出し、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めた。また、Trolox の IC<sub>50</sub> を求め、TEAC (Trolox の IC<sub>50</sub>/試料の IC<sub>50</sub>) を算出した。

3) キハダ抽出物：添加物試料 15 mg に MeOH 1 mL を加えて溶解し、試料溶液とした。また各生薬末 (オウレン及びオウバク) 100 mg に MeOH 10 mL を加えて 5 分間超音波処理後、遠心分離した上澄みを生薬の試料溶液とした。標品とし

た化合物 (5 成分) については、1 mg/mL (MeOH) に調製し、標準溶液とした。

### C. 結果及び考察

#### C-1) ショウガ抽出物

ショウガ抽出物 (4.1 g) について、液液分配、次いで各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製の結果、[6]-gingerol (63.8 mg), [8]-gingerol (3.4 mg), [10]-gingerol (7.0 mg), [6]-shogaol (13.6 mg) を単離、同定した。得られた化合物は、NMR, MS の機器分析データに基づき解析し、これらも標品として用いた。ショウガ抽出物の主成分とされる [6]-gingerol, [6]-shogaol, その他の化学構造について図 1 に示す。

試料溶液について HPLC 分析を行った結果、2 成分 ([6]-gingerol, [6]-shogaol) のピークが主検出されて観察され、それ以外のピークについて標品と直接比較した結果、citraol (neral, geraniol の混合物), [8]-shogaol, zingiberene,  $\beta$ -phellandrene のピークを同定した (図 2)。HPLC 結果からわかるように、主成分とされる 2 成分以外の成分についても、製品により検出は一定ではないことが示された。ピークパターンから製品間の違いを検討した結果、① [6]-gingerol が主検出 (製品 1~3), ② [6]-gingerol 及び [6]-shogaol いずれも検出 (製品 7~9), ③ いずれも検出せず (製品 4~6, 10~12) の 3 グループに分類され、主成分がいずれも顕著に検出されない製品が 6 検体確認された。①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物、②はショウガ抽出物、③は香辛料抽出物とするもので、用途により成分分布が異なることが分析データからも確認された (図 2)。よって、用途をショウガ抽出物とする場合、[6]-gingerol 及び [6]-shogaol をどちらかあるいはいずれも検出することを確認する等に対応できることが考察された。

食品のショウガ、生薬のショウキョウ、カンキョウについて、それぞれについて調製したアセトンエキス、酢酸エチルエキス、*n*-ヘキサンエキスについて HPLC 分析を行った。いずれのエキスについても、ショウガは [6]-gingerol が主検出され、ショウキョウ、カンキョウは [6]-gingerol 及び [6]-shogaol が検出され、生薬は日本薬局方において規定されている指標成分が観

察された (図 3).

### C-2) ヒマワリ種子抽出物

添加物 3 製品について逆相 HPLC で分析した結果, 共通して主検出する 3 つのピークを確認した (図 4). 製品のうちの一つについて, Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分 (①~③) に分画し, さらに③MeOH 溶出部について, Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分 (④~⑥) に分画した. 各画分の HPLC クロマトグラムを図 5 に示す. 成分精査を目的に, ②30%MeOH 溶出部について YMC GEL ODS カラムクロマトグラフィーを行った結果, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) 及び caffeic acid を単離, 同定した. さらに, ④~⑥について YMC GEL ODS カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返した結果, イソクロロゲン酸類 (3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid, 3,4-*di-O*-caffeoylquinic acid, 3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid) とともに, 文献未記載の化合物 1 及び 2 を単離した. 各化合物の構造を図 6 に示す.

化合物 1 は, 淡黄色無晶形粉末として得られ, 高分解能マスマスペクトルから, 分子式  $C_{26}H_{25}NO_{12}$  であることが示された. 各種 NMR データを解析した結果, キナ酸及びカフェオイル基各 1 個に特徴的なシグナルが観察された. その他のシグナルをみると, 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid に特徴的なシグナルが観察された. HMBC スペクトルにより各ユニットの結合位置について確認した結果, キナ酸の 5 位にカフェオイル基, 3 位に 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合した構造であることが確認された. また, CD スペクトルの結果から 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットの 3 位は *S* 配置であると構造決定した.

化合物 2 の NMR スペクトルデータは, 化合物 1 と同様に, キナ酸, カフェオイル基及び 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットに特徴的なシグナルが観察されたことから, これらを部分構造として構成される構造が推定され

た. 各ユニットのつながりを明らかにするため, HMBC スペクトルを測定したところ, キナ酸の 5 位にカフェオイル基, 4 位に 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合した構造であることが確認された. 化合物 1 と同様に, 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットの 3 位については, CD スペクトルの結果から *S* 配置であると構造決定した.

本添加物の活性本体を検討する目的で, 添加物 3 製品及び添加物の Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーによる分画物①~③の DPPH ラジカル消去活性について評価した. 各分画物については, 算出した TEAC 値に収量を乗じて全体の寄与度として求めた. 結果を表 1 に示す. その結果, ヒマワリ種子抽出物の活性への寄与は, ①H<sub>2</sub>O 溶出部, ②30%MeOH 溶出部が大きいことが示唆された. 一方, ③MeOH 溶出部の収量は少量であるが TEAC 値は高く, 本画分も活性に寄与していることが考察された. ①及び②画分の含有成分について HPLC の結果をみると, モノカフェオイルキナ酸類 [chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid] の含有が認められる. また, ③画分からはジカフェオイルキナ酸 [イソクロロゲン酸: 3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid, 3,4-*di-O*-caffeoylquinic acid, 3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid] が単離された. よって, これら化合物が活性へ寄与することが考察される. そこで単離同定した各化合物の DPPH ラジカル消去活性を評価した. その結果を表 2 に示す. モノカフェオイルキナ酸類は IC<sub>50</sub>: 12.3~14.2 μM, ジカフェオイルキナ酸類は IC<sub>50</sub>: 6.1~7.0 μM で, いずれも Trolox (IC<sub>50</sub>: 24.1 μM) よりも強い活性を示し, caffeoyl 基の数により, 活性が高くなる傾向が認められた. 化合物 1 及び 2 については, ③画分から単離された. 同様に, 各化合物について DPPH ラジカル消去活性を評価した結果, 化合物 1 は IC<sub>50</sub>: 33.5 μM, 化合物 2 は 28.5 μM で, Trolox とほぼ同等の値を示し, これらも本添加物の有効成分の一つとして考察された.

### C-3) キハダ抽出物

局方のオウバクの確認試験を準用し, 生薬オ

ウバク、オウレンとキハダ抽出物の TLC 分析を行ったところ、キハダ抽出物はオウバクと同様のスポットを示し、berberine, palmatine を認められ、berberine が主検出して認められた (図 7)。それゆえ、局方と同じ試験法で対応可能であることが示唆された。

#### D. 結論

1) 既存添加物ショウガ抽出物について、添加物製品12検体の逆相HPLCによる成分比較を行った結果、① [6]-gingerolが主検出、② [6]-gingerol 及び[6]-shogaolいずれも検出、③ いずれも検出せずの3グループに分類され、主成分がいずれも顕著に検出されない試料も認められた。その他の成分についても、検出は製品により一定ではなかった。製品用途からみると、①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物、②はショウガ抽出物、③は香辛料抽出物とするもので、用途により成分分布が異なることが確認された。よって、ショウガ抽出物を用途とする場合、[6]-gingerol 及び[6]-shogaolをいずれかまたはどちらかを認めることで対応できることが考察された。また、原料となるショウガは[6]-gingerolが主検出され、同じ基原を原料とする生薬のショウキョウ、カンキョウは[6]-gingerol及び[6]-shogaolが検出され、生薬は日本薬局方における指標成分が観察された。それゆえ、添加物についても成分規格を示し、一定の同等性を確認する必要性が考察された。

2) 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の含有成分について精査した結果、共通して主検出する3成分が認められ、構造解析の結果、モノカフェオイルキナ酸類 (chlorogenic acid, 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid) と同定した。その他の成分についても精査した結果、ジカフェオイルキナ酸類 (イソクロロゲン酸類: 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid) を単離同定した。また、文献未記載の化合物2種を単離し、化合物1はキナ酸の5位にカフェオイル基、3位に2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acidユニットがエステル結合した構造と決定した。化合物2はキナ酸の5位にカフェオイル基、4位に2-oxo-3-hydroxy-

indole-3-acetic acidユニットがエステル結合したものと構造決定した。活性に寄与する成分を明らかにするため、添加物試料溶液を分画し、DPPHラジカル消去活性を指標に活性画分について検討した結果、3種のモノカフェオイルキナ酸類の寄与が示唆された。また、収量の少ない画分に認められる3種のジカフェオイルキナ酸類も高い活性値を示し、これら成分も活性への寄与が考察され、モノ及びジカフェオイルキナ酸が有効成分として示唆された。また、化合物1及び2はTroloxとほぼ同等の活性値を示し、本添加物の有効成分の一つとして考察された。

3) 既存添加物キハダ抽出物の TLC 分析について、局方のオウバクの確認試験を準用して検討した結果、キハダ抽出物はオウバクと同様に berberine, palmatine のスポットを認め、berberine が主検出して確認された。

#### 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) 第十八改正日本薬局方, 厚生労働省(2021).
- 3) 第 5 版既存添加物自主規格, 2021 年 4 月, 一般社団法人日本食品添加物協会

#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表等

- 1) 長井理夏子, 内倉 崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析, 第 60 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 (2021.11.8~2021.11.21) (WEB 開催)
- 2) 天倉吉章, 内倉 崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の成分解析, 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.25~2023.3.28) (北海道)

##### 2. 論文発表等

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

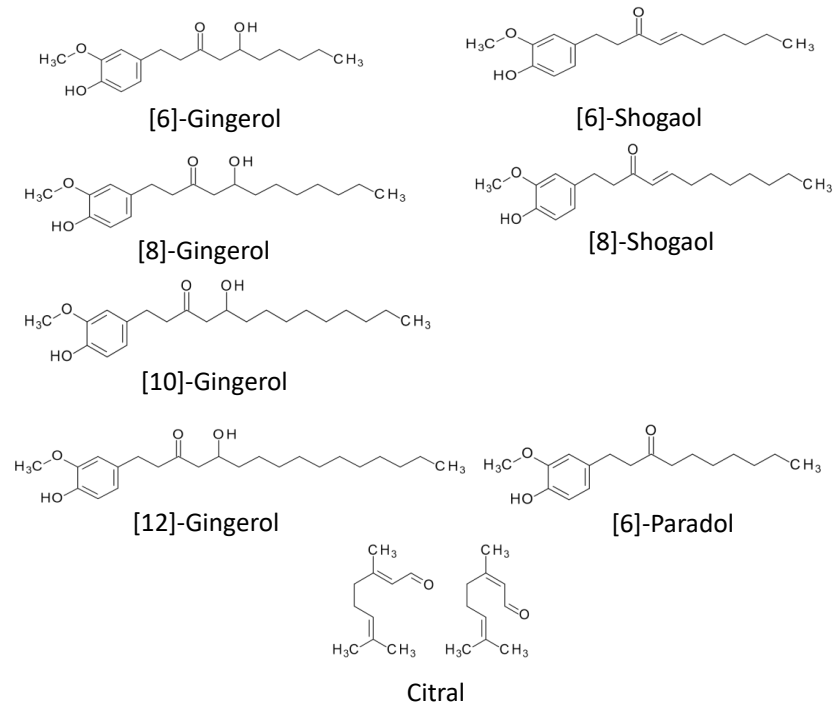


図1. ショウガ抽出物含有成分の化学構造

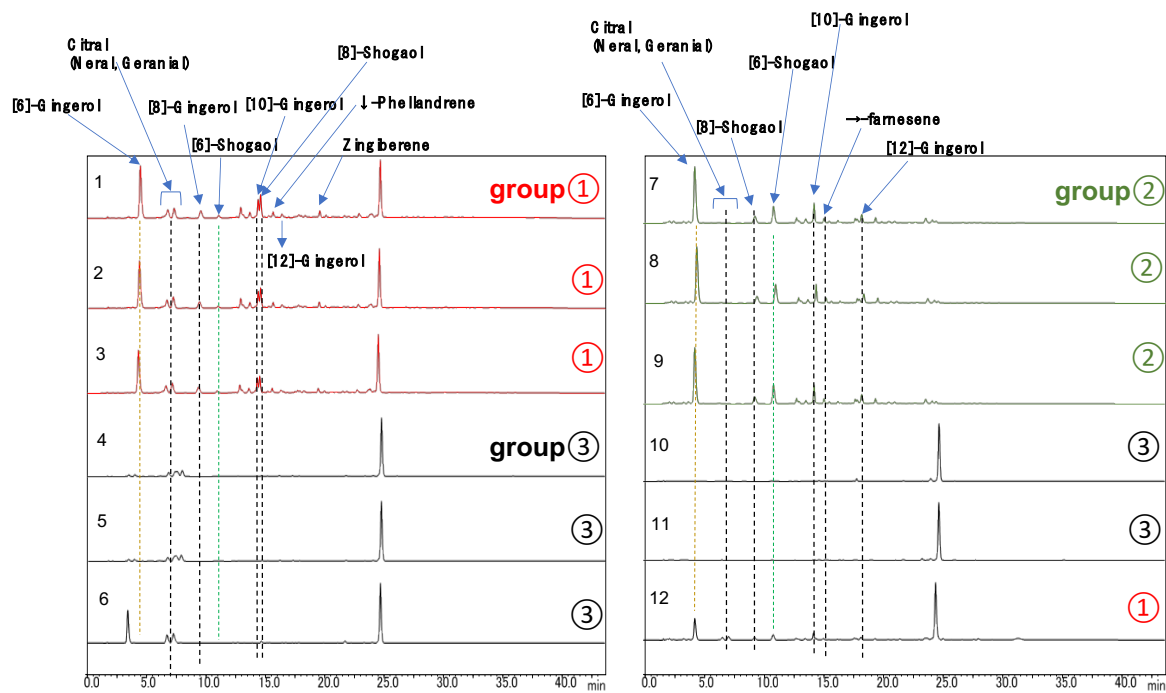


図2. ショウガ抽出物のHPLCクロマトグラム

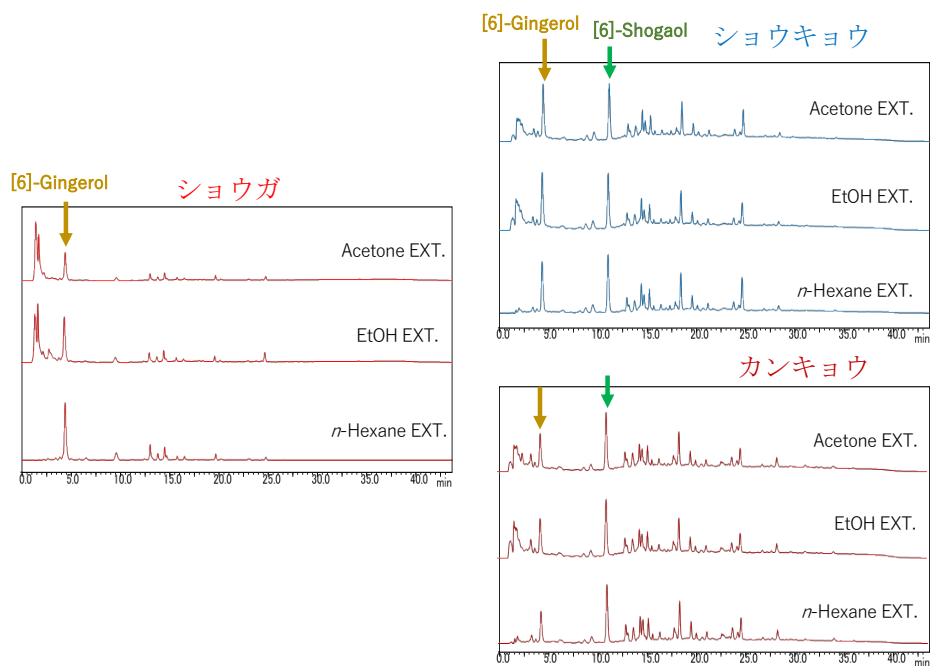


図3. ショウガ, ショウキョウ, カンキョウのHPLCクロマトグラム

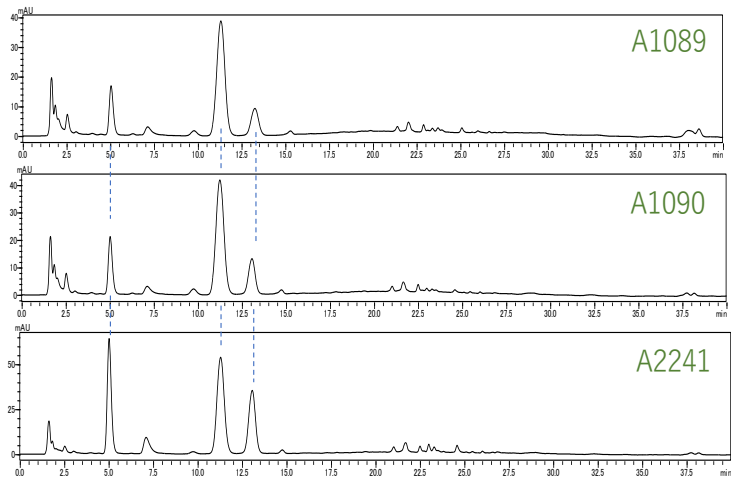


図4. ヒマワリ種子抽出物の HPLC クロマトグラム

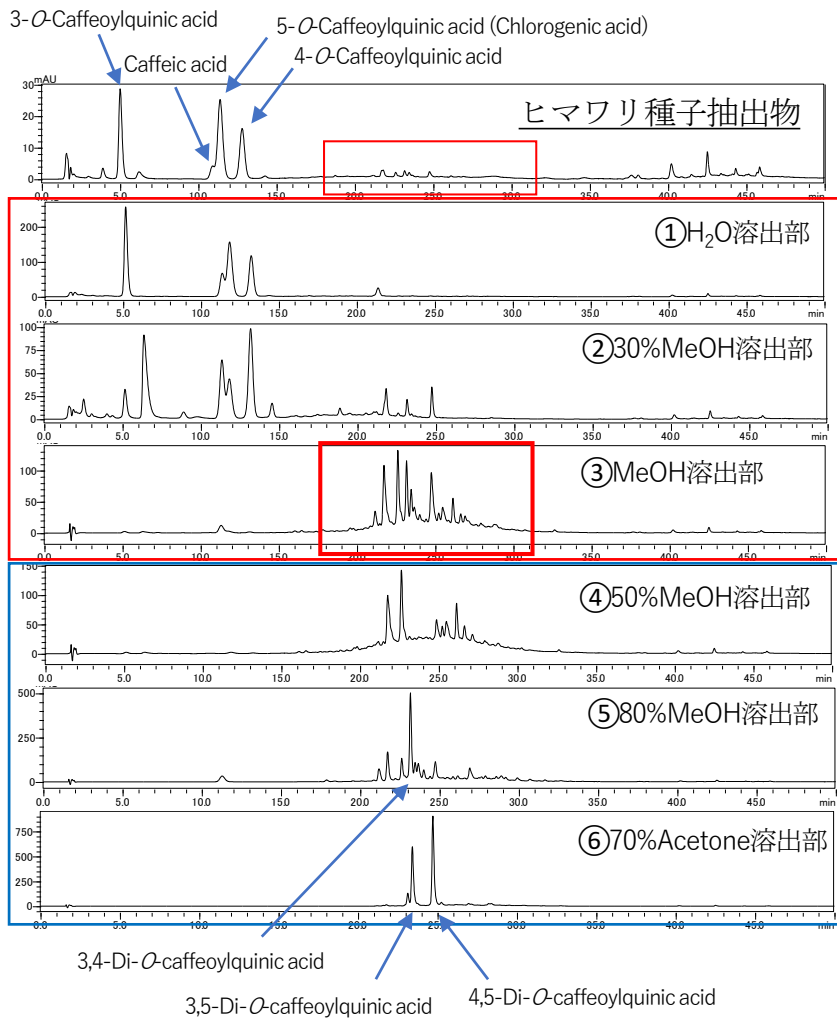


図5. ヒマワリ種子抽出物分画物の HPLC クロマトグラム



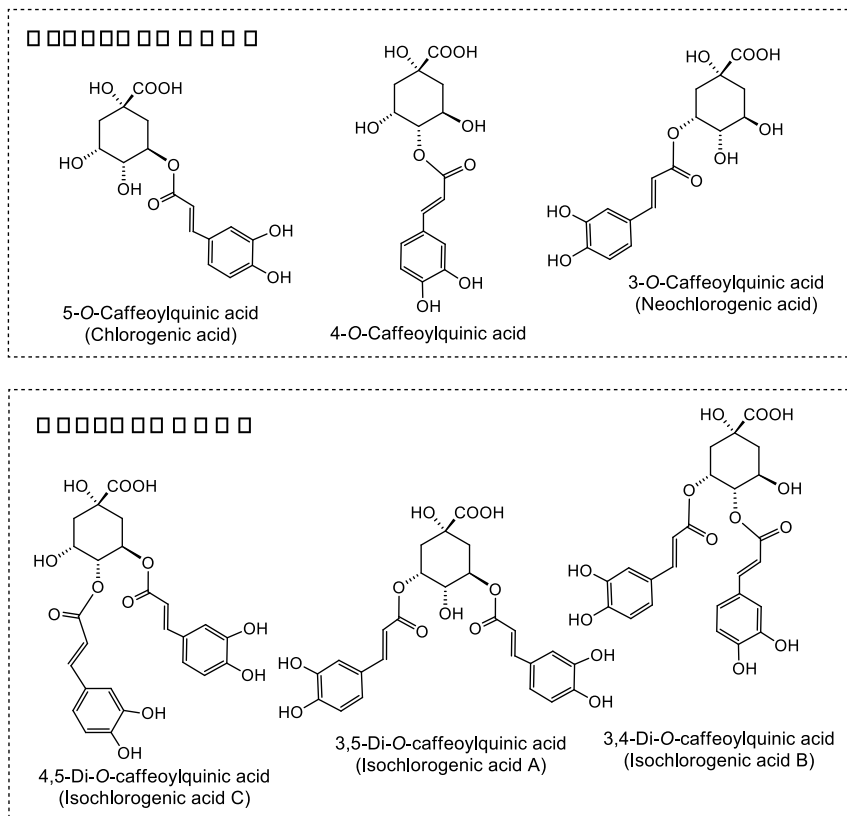
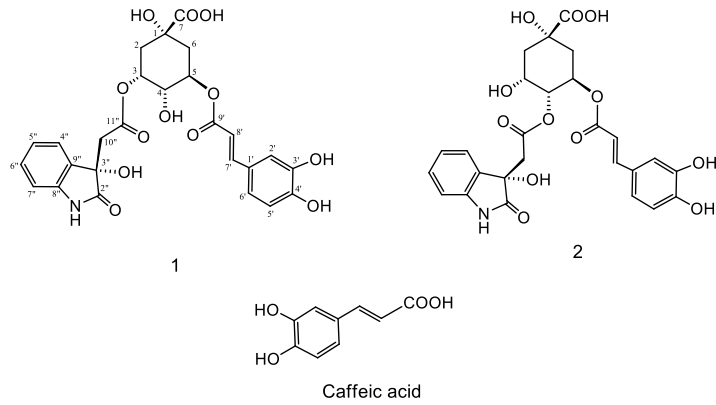


図 6. ヒマワリ種子抽出物含有成分の化学構造

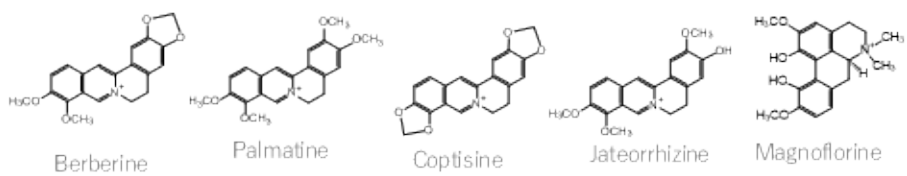
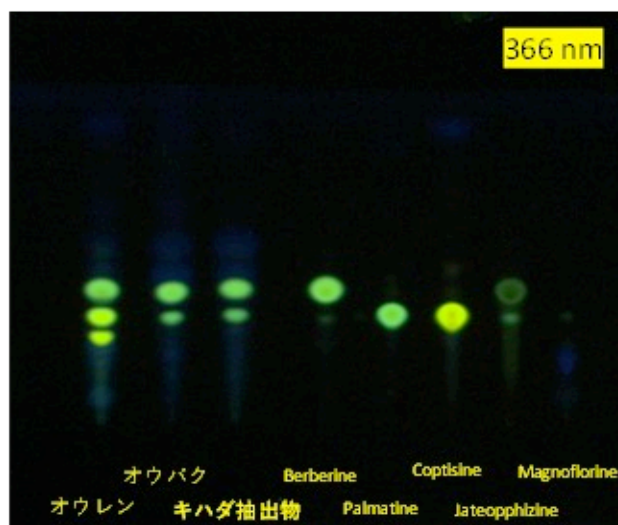


図 7. キハダ抽出物の TLC 分析

表 1. ヒマワリ種子抽出物及び分画物の DPPH ラジカル消去活性

	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	TEAC	収量 (寄与度)
添加物 (A1089)	229.5	0.028	
添加物 (A1090)	152.9	0.039	
添加物 (A2241)	136.4	0.047	
①H <sub>2</sub> O溶出部	115.6	0.054	62.5 (3.38)
②30%MeOH溶出部	97.8	0.065	20.8 (1.35)
③MeOH溶出物	23.5	0.268	1.4 (0.38)

表 2. ヒマワリ種子抽出物含有成分の DPPH ラジカル消去活性

	IC <sub>50</sub> (μM)	TEAC
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	14.2	1.27
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	12.3	1.46
Chlorogenic acid	13.8	1.30
Caffeic acid	32.1	1.05
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	7.0	1.75
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	6.1	1.99
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	6.2	1.96