

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～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 臨床分析化学研究室 教授

研究要旨 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* L.）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。昨年度に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、高純度のサンタリンA（SA）およびサンタリンB（SB）が得られたが、同時に未知の色素成分も獲得することができた。そして、この成分をHPLCで測定したが検出感度が低かったため、再解析を行なった。HSCCCやHPLCの測定条件について再検討したが、分析は困難であると判断した。そこで、TLCによる分析を行い、その結果、シタン色素に含まれる成分のRf値を求めることができた。今後さらに成分解析を進めていくために、成分の再評価とHSCCCによる単離精製の検討を合わせて進めていくこととする。

研究協力者

高橋未来 立命館大学大学院薬学研究科
博士課程

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。

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、黄疸、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⁾

昨年度は、高速向流クロマトグラフィー（High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC）を用いてシタン色素からSA及びSBの単離精製を行い、同時に未知の色素成分(Fr.1)も獲得することができた。しかし、この成分は検出感度が低かった。

ゆえに、HSCCCを用いて再びシタン色素の主成分評価を行い、HPLC及びTLCを用いて分析条件の検討を行うこととした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

シタン色素は、粉末のジーエスインターナショナル社製<B140>と液状の三栄源エフエフアイ社製<C2012>を用いた。なお、<>内は国

立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号を示す。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52
ロータリーエバポレーター：東京理化学器械社製 N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000
薄層板：Merck 社製 Silica gel 60 F₂₅₄

HPLC 装置：日立ハイテックサイエンス社製 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

B-2) 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℃

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-540 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)

B-3) シタン色素の HSCCC の分離分析

対象試料にはジーエスインターナショナル社製から獲得した Fr.1 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、メチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, 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。

B-4) シタン色素の TLC の分離分析

対象試料はシタン色素、単離精製によって獲得した SA, SB, Fr.1 とし、メタノールで調製した。展開溶媒には酢酸エチル：メタノール(9:1)を用い、自然光および254 nm でスポットを確認した。

C. 結果及び考察

C-1) シタン色素の LC 分離分析

昨年度のシタン色素の HSCCC による単離で獲得した Fr.1 についての追加検討を行った。

まず始めに、HPLC にて測定条件の検討として、検出波長及び濃度の検討を行った。

赤色色素に関する文献を参考にして、検出波長 535 nm, 500 nm, 480 nm, 254 nm で測定し、ピーク強度を比較した。その結果の HPLC クロマトグラムを図 1 に示した。最もピーク強度が大きかったのは 500 nm であったため、従来通りの 500 nm で検出を行うこととした。

また、試料濃度によるピーク強度の変化の確認を行った。Fr.1 166 mg をメタノール 10 mL に溶解したものを基準溶液としてメタノールで希釈を行い、10 倍希釈、100 倍希釈、1000 倍希釈溶液を作成し、測定を行った。その結果の HPLC クロマトグラムを図 2 に示した。これより、希釈を行うことでピーク強度が小さくなったため、希釈をせずに測定を行うこととした。

以上の検討により、測定条件を決定し、Fr.1 を測定した結果、その結果、5.8 min と 8.2min にピークを検出した。(図 3)

C-2) シタン色素の HSCCC の分離分析

HSCCC による単離を再度実施するにあたり、二層溶媒の再検討を行った。その結果、メチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, V/V/V) を採用した。

Fr.1 の HSCCC による単離を実施した。二層

溶媒にはメチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, V/V/V) を用いた。なお、固定相の保持率は 47 % であり、分析時間は 150 分であった。HSCCC クロマトグラム (図 4) より、明確なピークは検出されず、また、上層に赤い成分が多く残り、分取することができなかった。

以上の結果より、HPLC および HSCCC による Fr.1 の分析は困難であると考えたため、TLC を用いて検討することとした。

C-3) シタン色素の TLC の分離分析

薄層版に Silica gel 60 F₂₅₄ を用いて展開溶媒の検討を行った結果、酢酸エチル:メタノール(9:1) で分離を行うことができた (図 5)。また、スポットの R_f 値を求め、表 1 に示した。この結果より、Fr.1, SA および SB の R_f 値を求めることができた。またシタン色素中にも同成分が含まれていることを確認することができたが、一方でスポット 1-5 のように、上記の成分以外のスポットも観察された。

D. 結論

本研究では、既存添加物シタン色素に含まれる、HPLC での検出が困難である Fr.1 を TLC によって分析することができた。しかし、同時にシタン色素には Fr.1, SA, SB 以外の成分が含まれていることが確認できた。今後は、シタン色素の成分の再評価と、主成分解析を行うために SA 及び

SB の更なる単離精製が必要であると考えられる。

E. 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*, 43-9 (2016)
- 3) 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. 2000-10-0

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし
2-2. 総説
なし
2-3. 単行本
なし

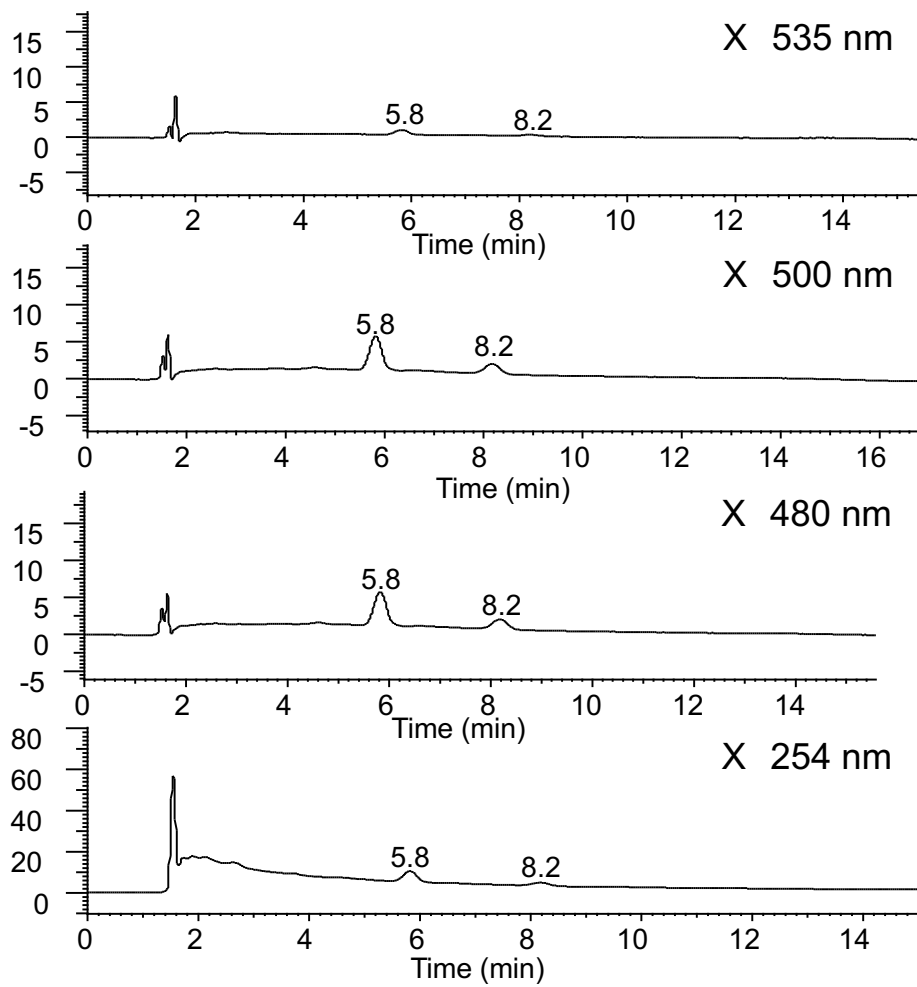


図1 シタン色素の HPLC クロマトグラム(検出波長)

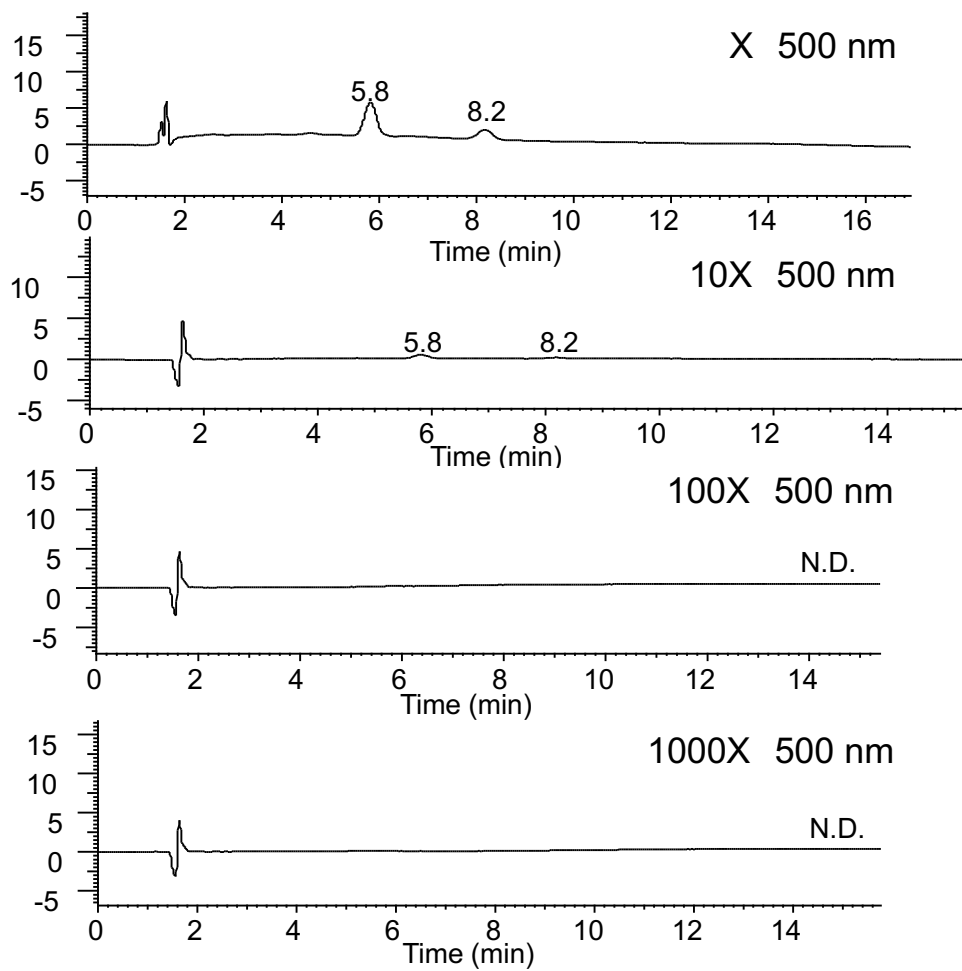


図 2 シタン色素の HPLC クロマトグラム(試料濃度)

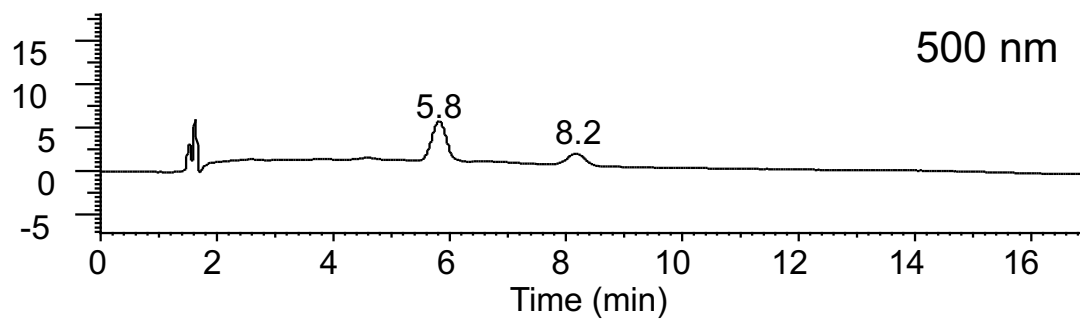


図3 シタン色素のHPLCクロマトグラム

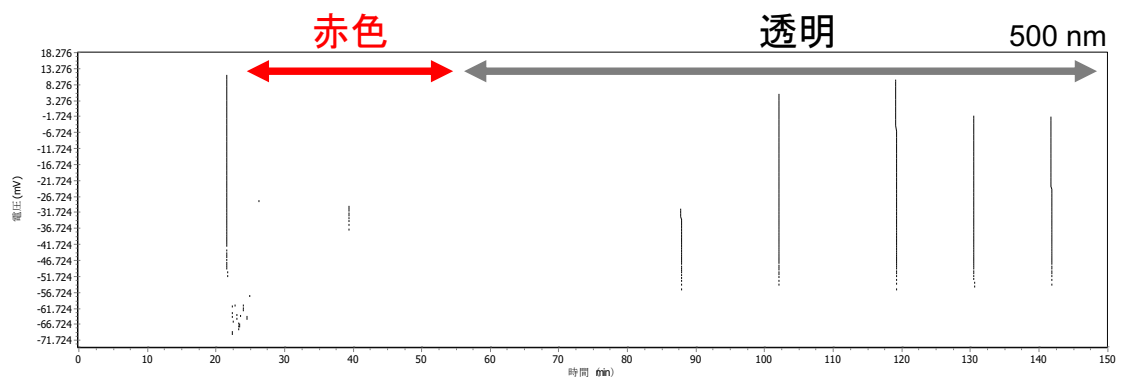


図4 シタン色素の HSCCC クロマトグラム

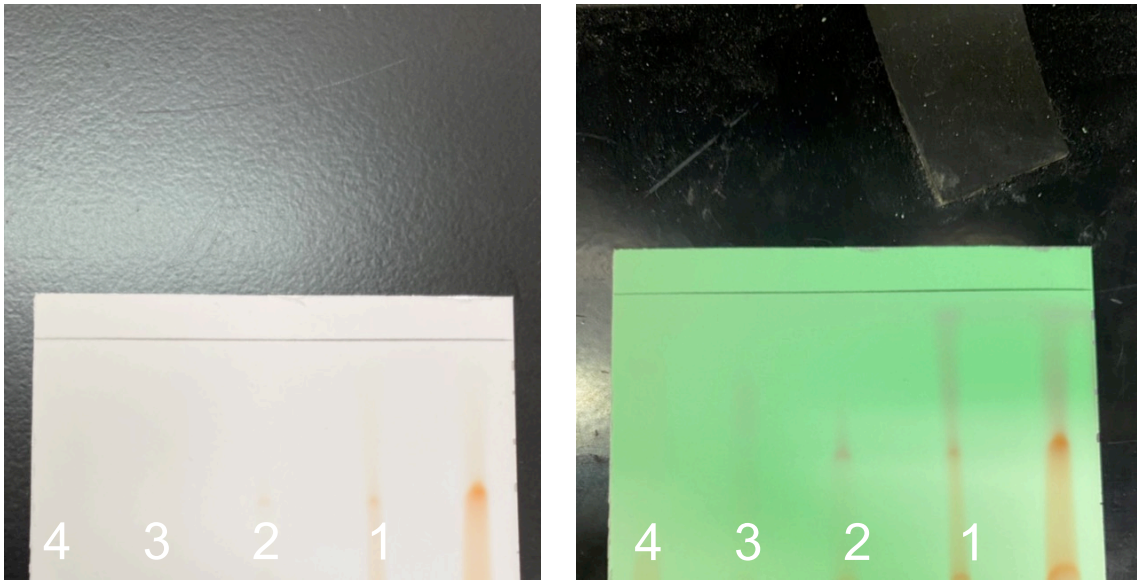


図 5 TLC 展開結果 (左 : 自然光, 右: 254 nm)

1:シタン色素 2: Fr.1 3:SA 4:SB

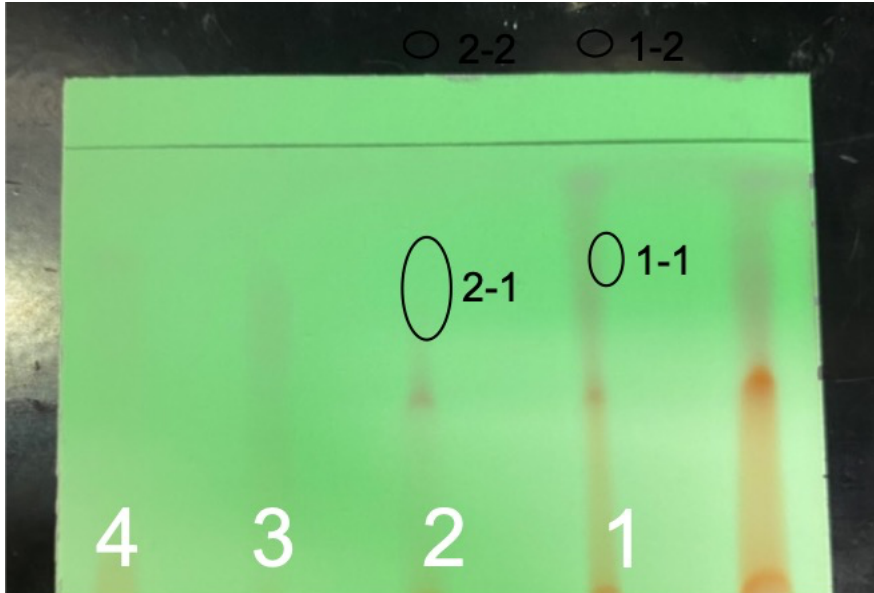


図6 スポット番号

表1 Rf値

サンプル名	a (cm)	b (cm)	Rf値(b/a)
1-1	4.05	1.00	0.25
1-2		2.85	0.70
1-3		3.00	0.74
1-4		3.35	0.82
1-5		3.85	0.95
2-1	4.10	0.90	0.22
2-2		2.90	0.71
3	4.10	2.95	0.72
4	4.10	3.40	0.83