

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7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なされる。本研究では、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。これまでの検討で、カロブ色素製品の HPLC 分析から主ピークを検出し、それらが schaftoside 及び schaftoside 配糖体であることを明らかにし、指標成分候補として schaftoside を見出した。また、schaftoside を指標とした TLC 分析による確認試験法について提案した。定量分析としては、schaftoside を直接分析する方法と、schaftoside 配糖体を β -グルコシダーゼによる酵素分解で 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。今年度はその続きとして、カロブ色素製品中の schaftoside の定量分析法について、グラジエント溶出の HPLC による相対モル感度 (RMS) 法について検討し、rutin 標準品によるカロブ色素中 schaftoside の定量分析を行った結果、絶対検量線法による定量データとほぼ近い値となることを示すことができた。

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

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、色調の確認の他、呈色反応による確認試験のみで、品質評価のための指標成分は示されていない。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実施しており、今年度はカロブ色素製品中の schaftoside の定量分析法について、グラジエント溶出における HPLC 分析での検討を行った。

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。イナゴマメの胚乳部は多糖類を豊富に含んでおり、

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。Schaftoside は一般試薬(富士フィルム和光純薬製, MedChemExpress)を用い, rutin は食品添加物試験用ルチン標準品(3水和物, 富士フィルム和光純薬製)を使用した。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。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: 340 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(溶媒はいずれもナカライテスク製) [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%)].

B-3) 試料溶液の調製

Schaftoside は 4 濃度(1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)で検量線を作成した。また、製品の抽出溶媒を検討するため、メタノール(MeOH), エタノール(EtOH), 50%MeOH, 50%EtOH, H₂O の 5 種類で抽出し、各試料溶液について schaftoside 量を絶対検量線法により算出した。Rutin 3 水和物に対する schaftoside の RMS 値は、それぞれの標準溶液(1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)を調製し、得られた面積値を用いてそれぞれの検量線を作成し、その傾きの比から決定した。

C. 結果及び考察

C-1) 抽出溶媒の検討

カロブ色素製品中の schaftoside 量について、これまで分析してきた条件(グラジエント溶出条件)で予試験的に検討した。検出波長はこれまでの 280 nm から、schaftoside の極大吸収を参考に 340 nm に設定した。Schaftoside は 4 濃度

(1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)で検量線を作成した(図 1)。また、製品の抽出溶媒を検討するため、MeOH, EtOH, 50%MeOH, 50%EtOH, H₂O の 5 種類で抽出し、各試料溶液について schaftoside 量を絶対検量線法により算出した。その結果、H₂O が最も定量値が高い結果(5.0 mg/g)となった(MeOH, EtOH, 50%MeOH, 50%EtOH; それぞれ、2.3, 0.65, 4.8, 4.8 mg/g)(図 2)。昨年度、酵素処理による定量分析法について、アイソクラティック溶出で絶対検量線法による定量値を報告していたが、その値とほぼ同じ結果であった。

C-2) 相対モル感度(RMS)を利用した分析法の検討

Schaftoside は試薬が高価であり、さらにフラボノイド C 配糖体で回転異性体による立体障害から、通常の実験条件では ¹H-NMR 解析が困難なこともあり³⁾、他の化合物を標準品とする相対モル感度(RMS)を利用した分析法について予備検討を実施することとした。標準品は schaftoside と同じフラボノイドで、食品添加物試験用として試薬が販売されているルチン標準品(rutin 3 水和物)を用いることとした。同じグラジエント溶出条件で HPLC 分析し、rutin 3 水和物に対する RMS 値を算出したところ、1.1326 であった(図 3)。この RMS 値を用いて、ルチン標準品によるカロブ色素中 schaftoside の定量分析を行った結果、4.7 mg/g となり、絶対検量線法による定量データ(5.0 mg/g)とほぼ近い値を求めることができた。このように、グラジエント溶出条件の予試験で分析可能であることが示唆されたことから、今後、他の化合物についても標準品としての適用を検討し、さらにアイソクラティック溶出における HPLC 分析条件を検討する予定であり、RMS を利用したカロブ色素中 schaftoside の定量分析の設定を目指す。

D. 結論

食品添加物カロブ色素製品に含有する schaftoside の定量分析に関する検討として、H₂O, 50%MeOH, 50%EtOH, MeOH, EtOH で

それぞれ抽出したものを試料溶液とし、HPLCによる絶対検量線法により **schaftoside** の定量分析を行った結果、抽出溶媒としては H₂O の抽出効率がよく、次いで 50%MeOH, 50%EtOH で、含水の方の抽出量が高い傾向が示唆された。また、RMS 法による分析について、ルチン標準品を使用した方法について検討した結果、絶対検量線法による定量データとほぼ近い値となり、グラジエント溶出条件の試験で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).
- 3) Nørbæk R., Brandt K., Kondo T.: J. Agric. Food Chem., 48, 1703-1707 (2000).

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 高松さくら, 鬼嶋七海, 内倉崇, 好村守生, 阿部裕, 杉本直樹, 天倉吉章: 食品添加物カロブ色素中に含有する **schaftoside** の定量分析に関する検討, 日本薬学会第146年会 (2026.3.36-29).

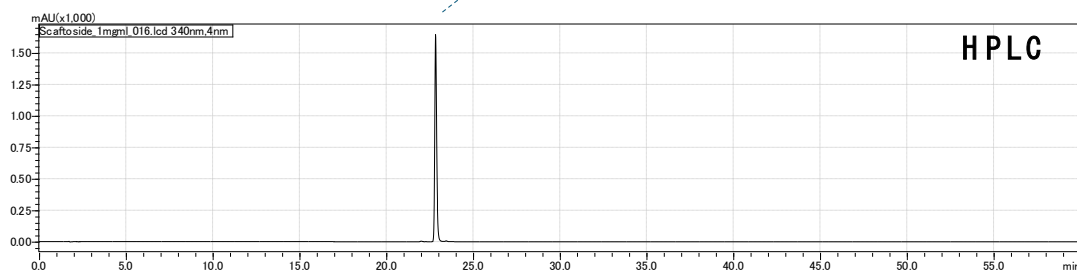
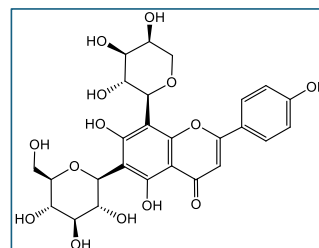
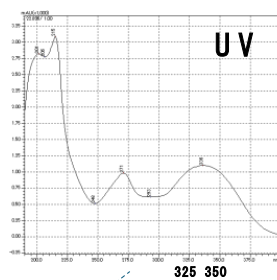
2. 論文発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Schaftoside



グラジエントHPLC条件

Shimadzu Prominence システム (島津製作所カラム: L-column ODS (2.1 ID. × 150mm, 5 μm))

(化学物質評価研究機構), カラム温度: 40 °C, 流速: 0.3 mL/min, 検出: UV 340 nm,

移動相: (A) 0.1 % 酢酸 in H₂O, (B) 0.1 % in CH₃CN [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→100 %)]

検量線 (1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)

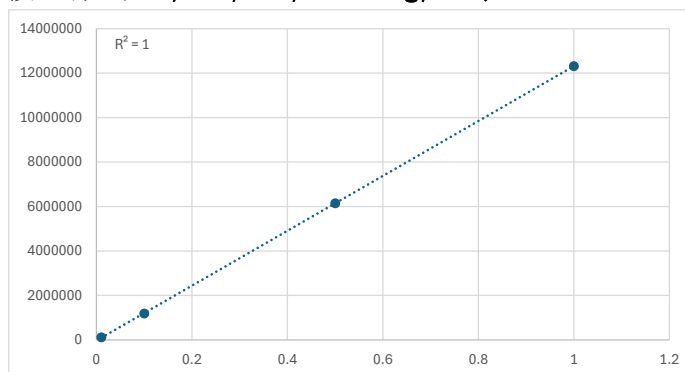
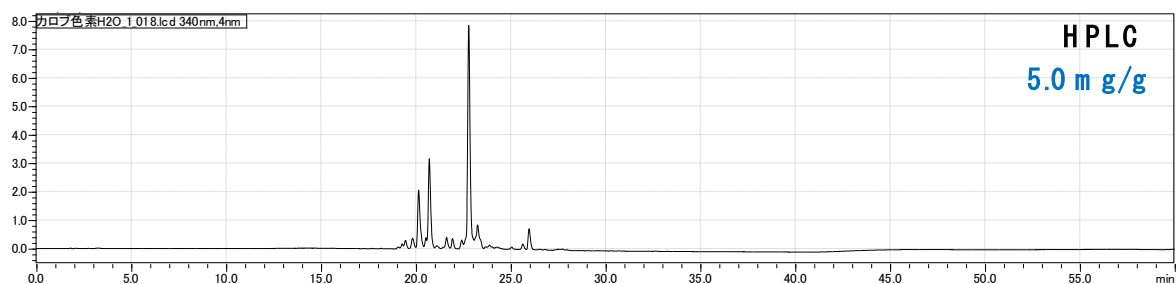


図 1. Schaftoside の HPLC クロマトグラム及び検量線

カロブ色素 (H₂O 抽出物)



カロブ色素製品中のschafthouse 定量値 (絶対検量線法)

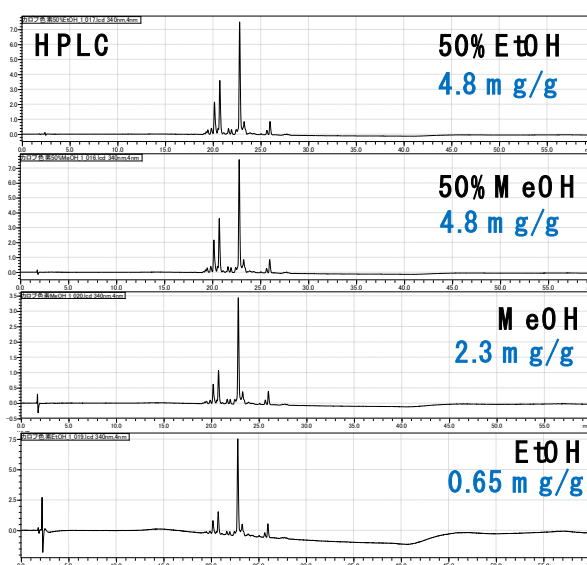
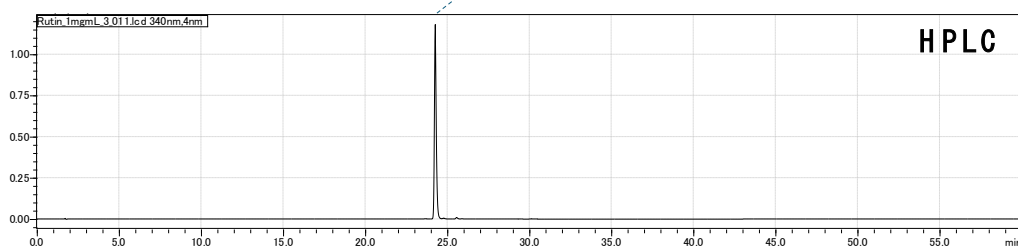
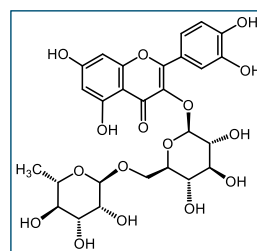
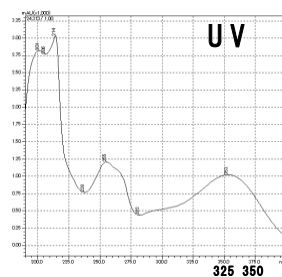


図 2. 抽出溶媒の比較

Rutin



グラジエントHPLC条件

Shimadzu Prominence システム (島津製作所カラム: L-column ODS (2.1 ID. × 150mm, 5 μm))

(化学物質評価研究機構), カラム温度: 40 °C, 流速: 0.3 mL/min, 検出: UV 340 nm,

移動相: (A) 0.1 %ギ酸 in H₂O, (B) 0.1 % in CH₃CN [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→100 %)]

Rutin 3水和物に対するSchaftosideのRMS値 (n=3)

1	1.1106
2	1.1510
3	1.1363
Average	1.1326
% RSD	1.81

図 3. Rutin の HPLC クロマトグラム及び RMS 値