

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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書
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。さらに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。IsoschaftosideはAdooq Bioscience製、schaftosideはCAYMAN CHEMICAL COMPANY製を用いた。分離、精製にはカラム充填剤として YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50)(ワイエムシィ製), 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(Methanol-*d*₄, DMSO-*d*₆)はEurisotop製を用いた。定量分析において、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。(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. × 150 mm, 5 μm)(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。ケミカルシフトは各溶媒由来ピーク [Methanol-*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カラムクロマトグラフィーにより得られた画分について、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。4. 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) 酵素処理

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)を行った。

B-8) 定量分析における試料溶液の調製

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、MeOH, エタノール(EtOH), 50%MeOH, 50%EtOH, H_2O 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) HPLC 分析及び化合物の同定

カロブ色素の 80%MeOH 可溶部について、HPLC 分析(検出波長: 280 nm)を行った結果、保持時間 20 分周辺に 4 つの主ピーク(ピーク 1 $\sim$ 4)が検出された。各ピークの UV スペクトルを確認したところ、ピーク 1 以外は同様のスペクトルパターンを示した。カラムクロマトグラフィーによる分離精製を行い、5 つの化合物〔dihydrophaseic acid β -D-glucoside, 2 種の schaftoside 配糖体, schaftoside, isoschaftoside〕

を単離し、ピーク 1 が 4'-dihydrophaseic acid β -D-glucopyranose ester, ピーク 2, 3 を schaftoside glucoside として、ピーク 4 として schaftoside として同定した(図 1)。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。

C-2) 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 2)、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-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、酵素処理による schaftoside に分解することが確認され、HPLC 分析においては、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。

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 4)。

C-6) 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。また、製品の抽出溶媒を検討するため、MeOH, EtOH, 50%MeOH, 50%EtOH, H_2O 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、 H_2O 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 4)。

C-7) 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、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、RMS 値を算出したところ、1.1489 であった(図 5)。この RMS 値を用いて、rutin 3 水和物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、他の化合物による標準品の検討、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、 H_2O または 50%MeOH 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

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、rutin 3 水和物を標準品として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).

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, 天倉吉章: 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) 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).

2. 論文発表等

- 1) Amakura Y, Uchikura T, Yoshimura M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N: Chromatographic Evaluation and Characterization of Constituents of Sunflower Seed Extract Used as Food Additives. Chem. Pharm. Bull., 2024; 72: 93-97 (<https://doi.org/10.1248/cpb.c23-00670>)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

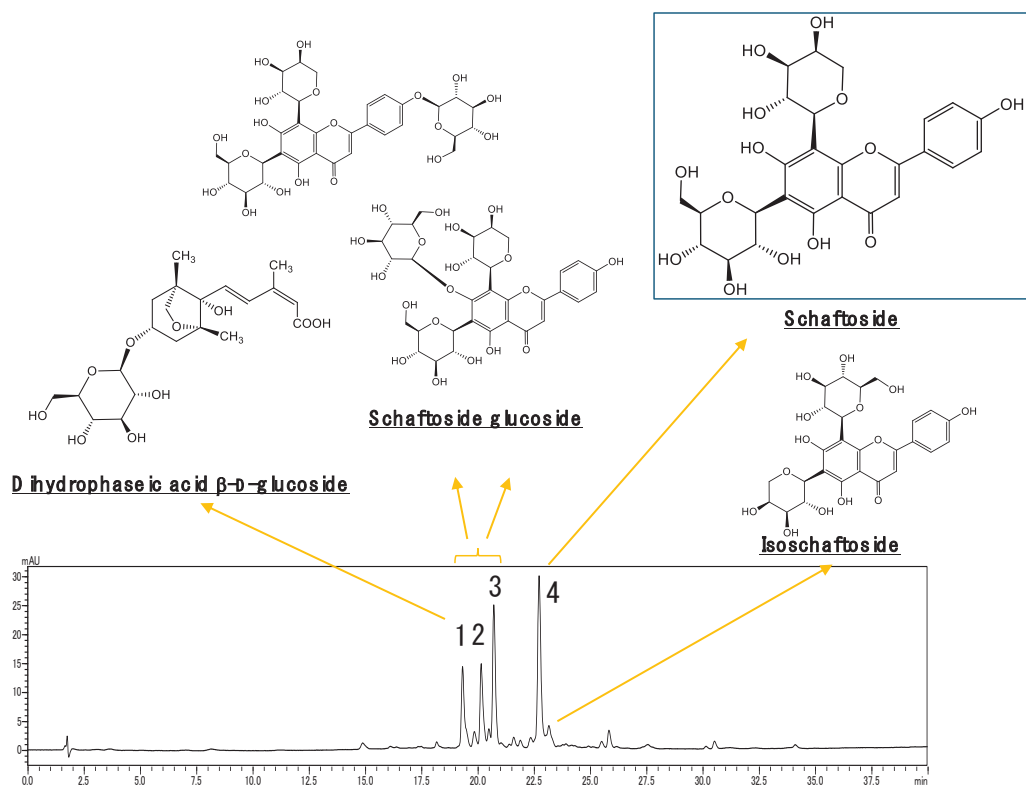


図 1. カロブ色素の HPLC クロマトグラム (条件 1)

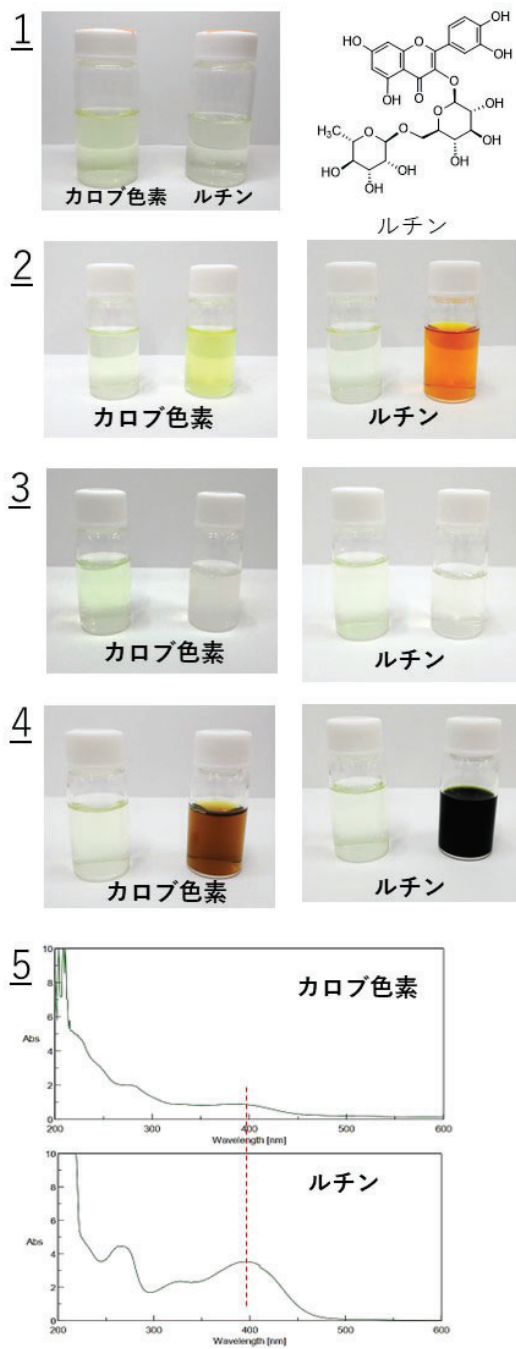
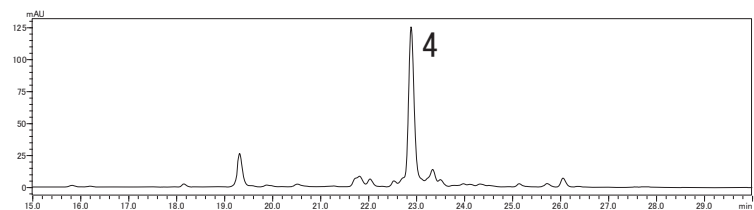
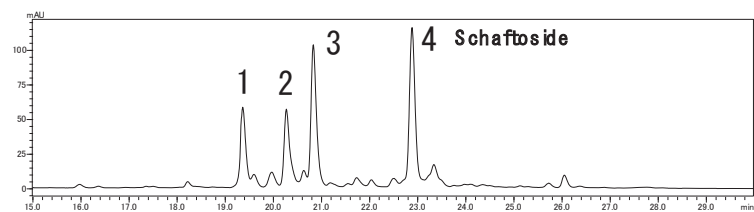


図 2. 公定法における確認試験 1～5

(条件1)



(条件2)

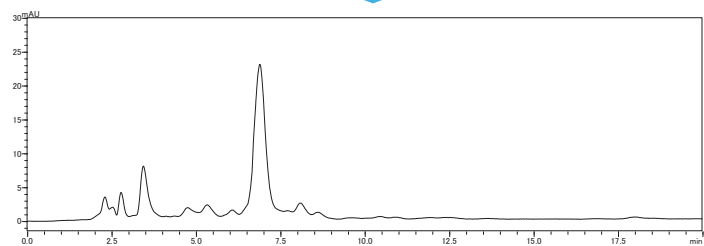
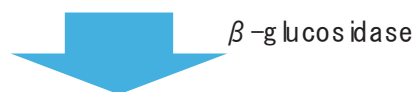
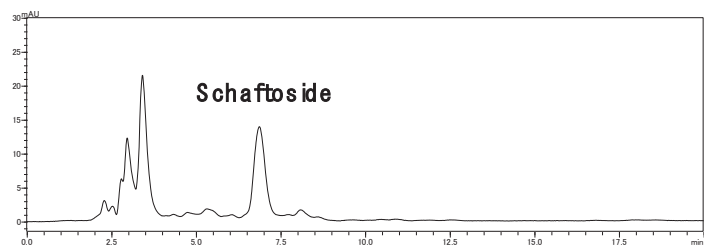
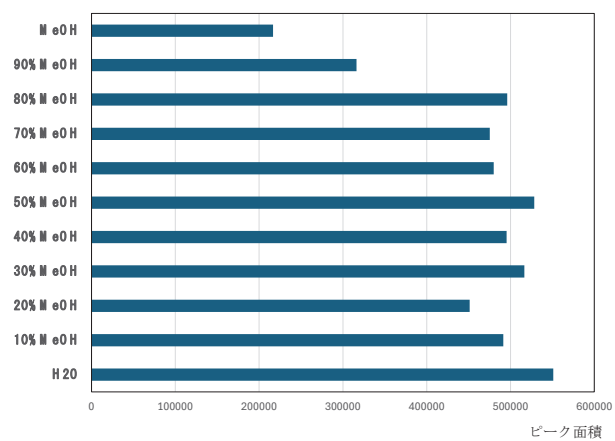
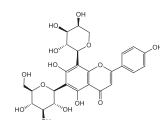


図 3. 酵素分解の HPLC クロマトグラム

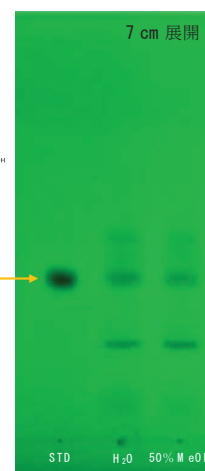
抽出溶媒の検討



TLC 分析



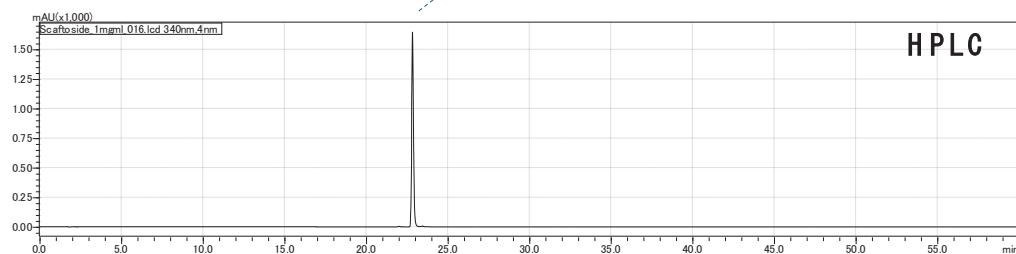
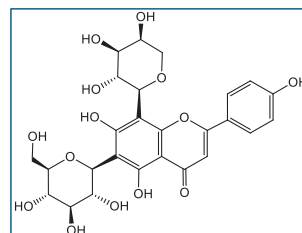
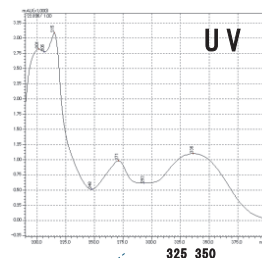
Schaftoside



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 μL
 検出 UV 照射 254 nm)

図 4. TLC 分析

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 % 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 %)]

検量線 (1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)

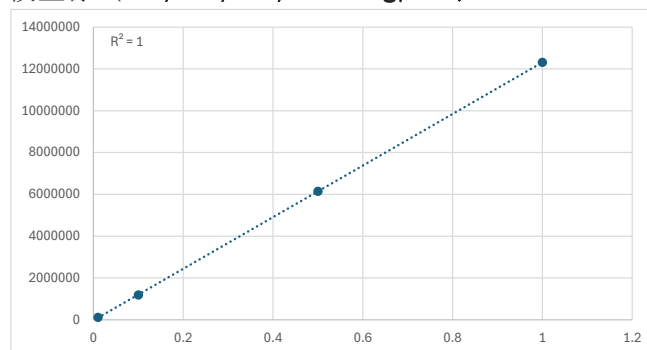
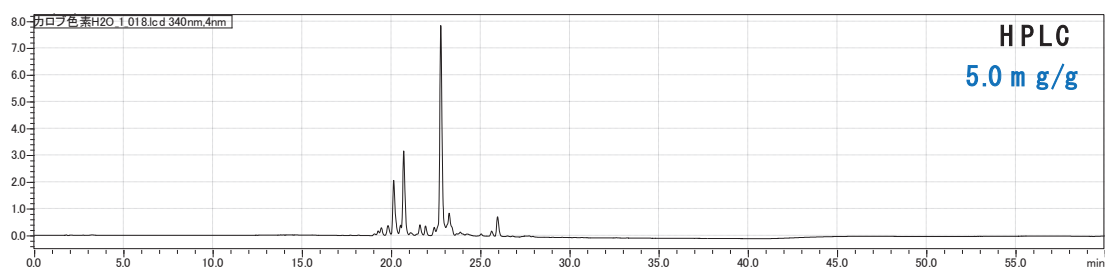


図 5. Schaftoside の HPLC クロマトグラム及び検量線

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)

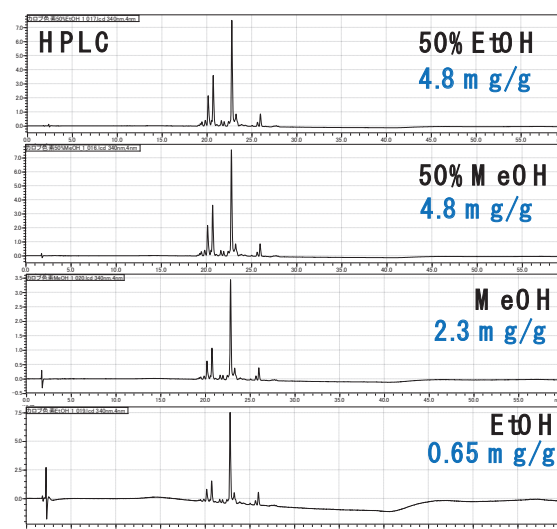
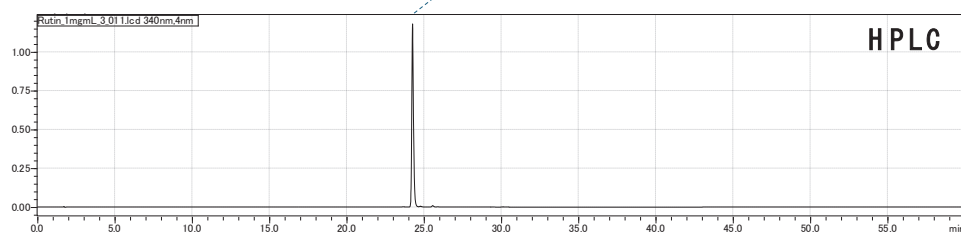
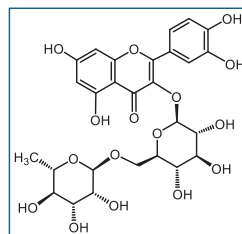
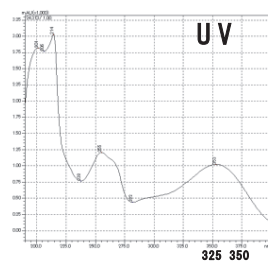


図 6. 抽出溶媒の比較

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に対するSchaftosideのRMS値 (n=3)

1	1.1265
2	1.1676
3	1.1526
Average	1.1489
% RSD	1.81

図 7. Rutin の HPLC クロマトグラム及び RMS 値