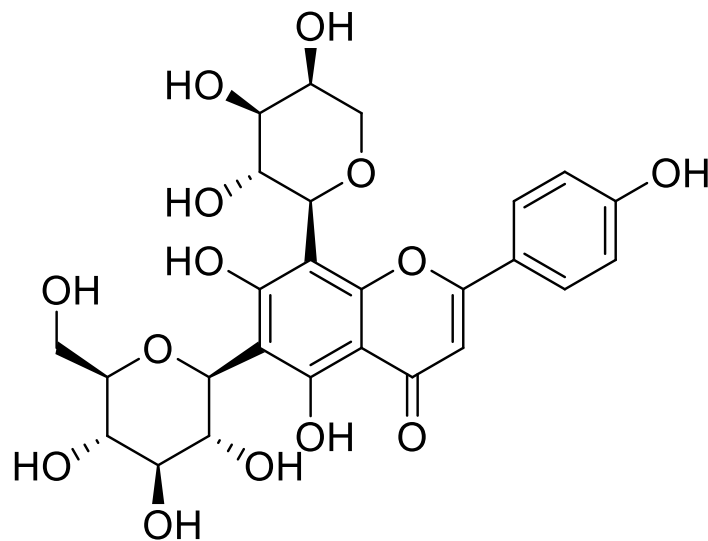


# 既存添加物「カロブ色素」の成分分析



○伊藤裕才, 石附京子, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩  
国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部

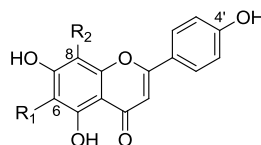
## 既存添加物「カロブ色素」の成分解析

○伊藤裕才, 石附京子, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩  
国立医薬品食品衛生研究所

【目的】既存添加物「カロブ色素」は「イナゴマメの種子の胚芽を粉砕したもの」と定義される着色料である。主成分はフラボノイドとされており、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。本添加物は、第9版食品添加物公定書への収載に向け、規格化が検討されているが、フラボノイド成分は未同定である。そこで、本研究では、主要フラボノイドの構造解析を行い、それらの含量を求めた。

【方法】試料：「カロブ色素」1製品、淡黄色粉末。試薬：apigenin (和光純薬), 2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸- $d_6$ ナトリウム塩(DSS- $d_6$ )標準物質(和光純薬)。機器：UPLC/ESI/TOF-MS (Xevo-G2TOF, Waters), NMR (ECA600, 日本電子)。抽出：試料(50mg)に70%MeOH(5mL)を加え、10分間超音波処理した後、濾過した。UPLC/TOF-MS分析：カラム：ACQUITY BEH C18 (2.1 mm i.d.×50 mm), 流速：0.3 mL/min, 温度：40 °C, 検出：330 nm, 移動相：A = 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O, B = 0.1% HCOOH/MeOH, 勾配条件：15% (5 min) → 25% (12 min-15 min) → 60% (20 min), ESI/TOF-MS 条件 (neg.), コーン電圧：30 V。UPLC定量：apigenin標品の純度はDSS- $d_6$ を基準物質としてqNMR法で検定した。NMR測定：DMSO- $d_6$ を溶媒として常温で測定した。糖分析：配糖体成分をHCl/MeOH中で加熱した後、遊離糖をTMS化してGC/FIDで分析した。

【結果】LC/TOF-MS分析により、試料中のフラボノイドは、分子量564のおよび分子量726の複数成分から構成されていた。分子量564の主要成分 (**1**および**2**) について2D-NMR測定により構造解析した結果、**1**はapigeninの6位および8位に $\alpha$ -L-arabinopyranosyl基(L-Ara)および $\beta$ -D-glucopyranosyl基(D-Glu)がそれぞれ炭素-炭素結合したisoschaftosideと判明した。また、**2**は**1**のWessely-Moser異性体であるschaftosideと判明した。炭素-炭素結合したL-Araは、酸性条件下において、 $\alpha \leftrightarrow \beta$ およびfuranosyl $\leftrightarrow$ pyranosylの変換が報告されている。そこで、**1**を4M HCl中で加熱した結果、**1**は**2**および試料中の複数の分子量564の成分に変換された。それらの1つはL-Araが8位に $\beta$ 結合したneoschaftoside (**3**)であった。分子量726の各成分を単離精製し、 $\beta$ -glucosidaseで処理した結果、分子量564の各成分に変換された。糖成分は、GC分析でD-glucoseと同定され、アルカリ条件での極大吸収波長から、4'位に結合していることが判明した。これらの結果から、試料中のフラボノイドは、**1**の異性体群およびその4'-O-glucosideと判明した。qNMR法で純度検定したapigenin標品の絶対検量線を作成し、UPLCで定量した結果、**1**の異性体群の含量は0.53%、その4'-O-glucosideの含量は0.60%と定量された。



1: R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -L-Ara, R<sub>2</sub> =  $\beta$ -D-Glu  
2: R<sub>1</sub> =  $\beta$ -D-Glu, R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -L-Ara  
3: R<sub>1</sub> =  $\beta$ -D-Glu, R<sub>2</sub> =  $\beta$ -L-Ara  
apigenin: R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H

# 既存添加物「カロブ色素」

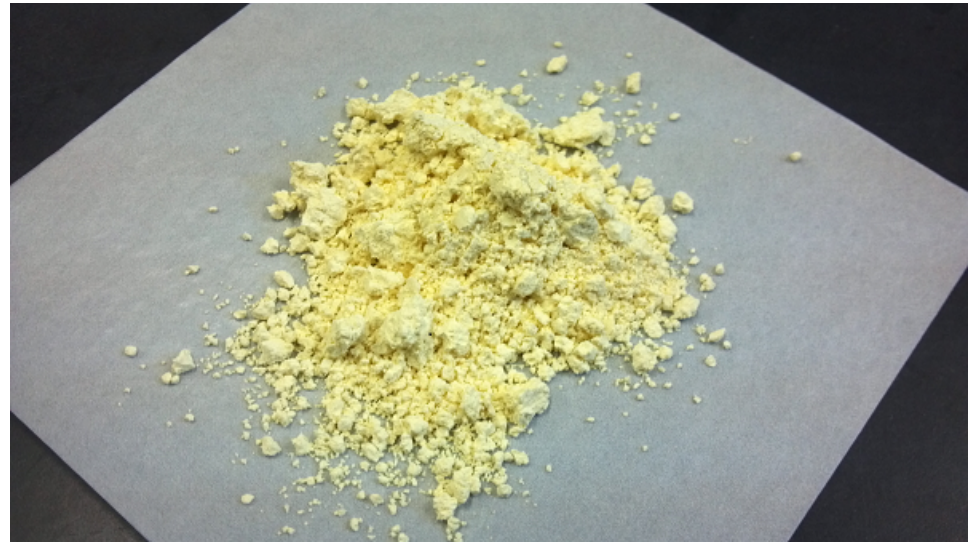
(第9版食品添加物公定書に収載予定)

**定義**：イナゴマメの種子の胚芽を粉砕して得られたものをいう。

**基原・製法・本質**：マメ科イナゴマメ(*Ceratonia siliqua* LINNE)の種子の胚芽を，粉砕して得られたものである。淡黄色を呈する。

**英名**：Carob germ colour

**用途**：着色料、製造用剤



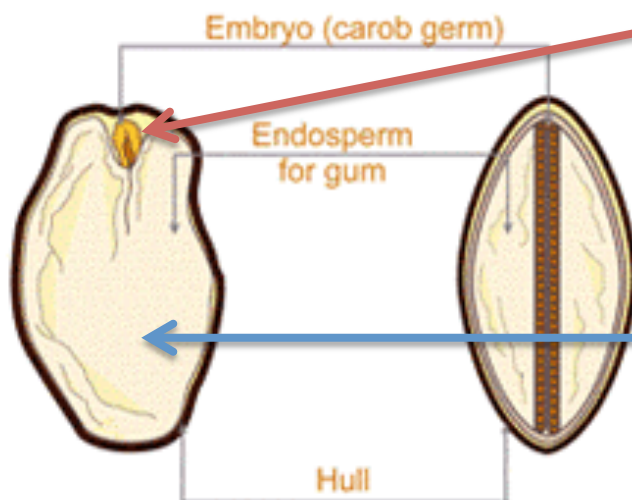
# イナゴマメ (*Ceratonia siliqua* L.)



Carob (Carob powder)  
鞘の果肉のパウダー。ココアの代用となる。



Locust Bean



**Carob germ colour**  
既存添加物「カロブ色素」  
胚芽の粉碎物。

Locust bean gum (E410)  
既存添加物「カロブビーンガム」  
胚乳から得られる多糖類。

# 「カロブ色素」の利用:中華麺の着色

*Asian alkaline noodle*



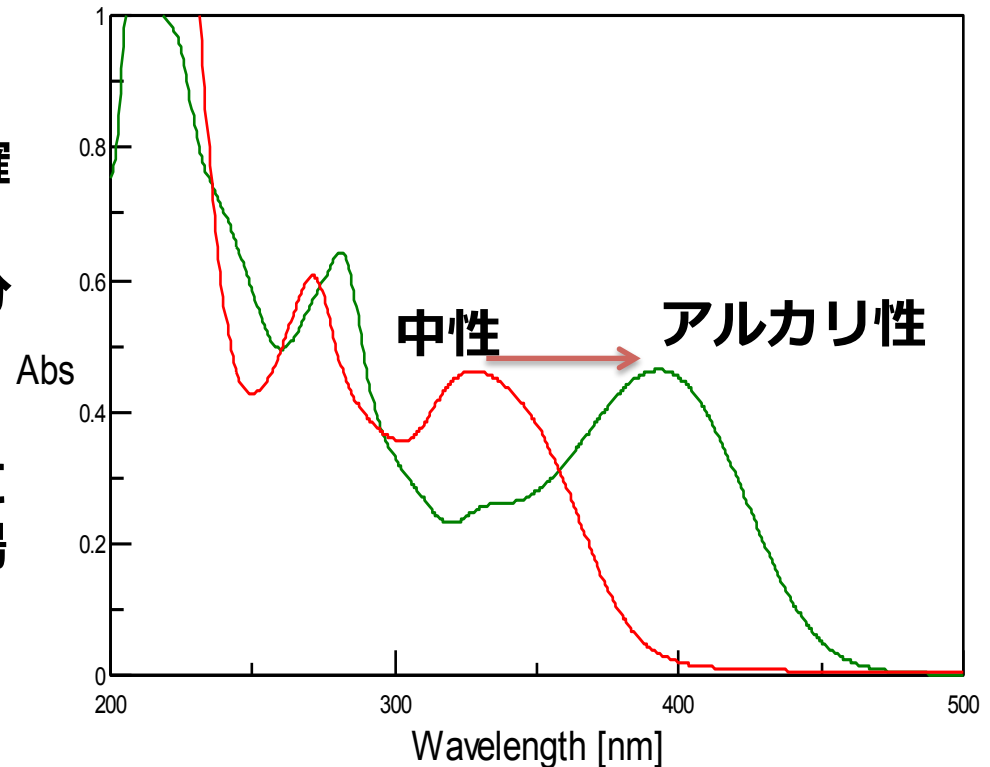
「カロブ色素」中の**フラボノイド**が、練り込まれた麺中のかんすい等による弱アルカリ性条件で、深色遷移することによって黄色に発色する。

しかしながら、これまでに「カロブ色素」の**フラボノイド**組成は報告がない。

# Extraction of carob germ colour

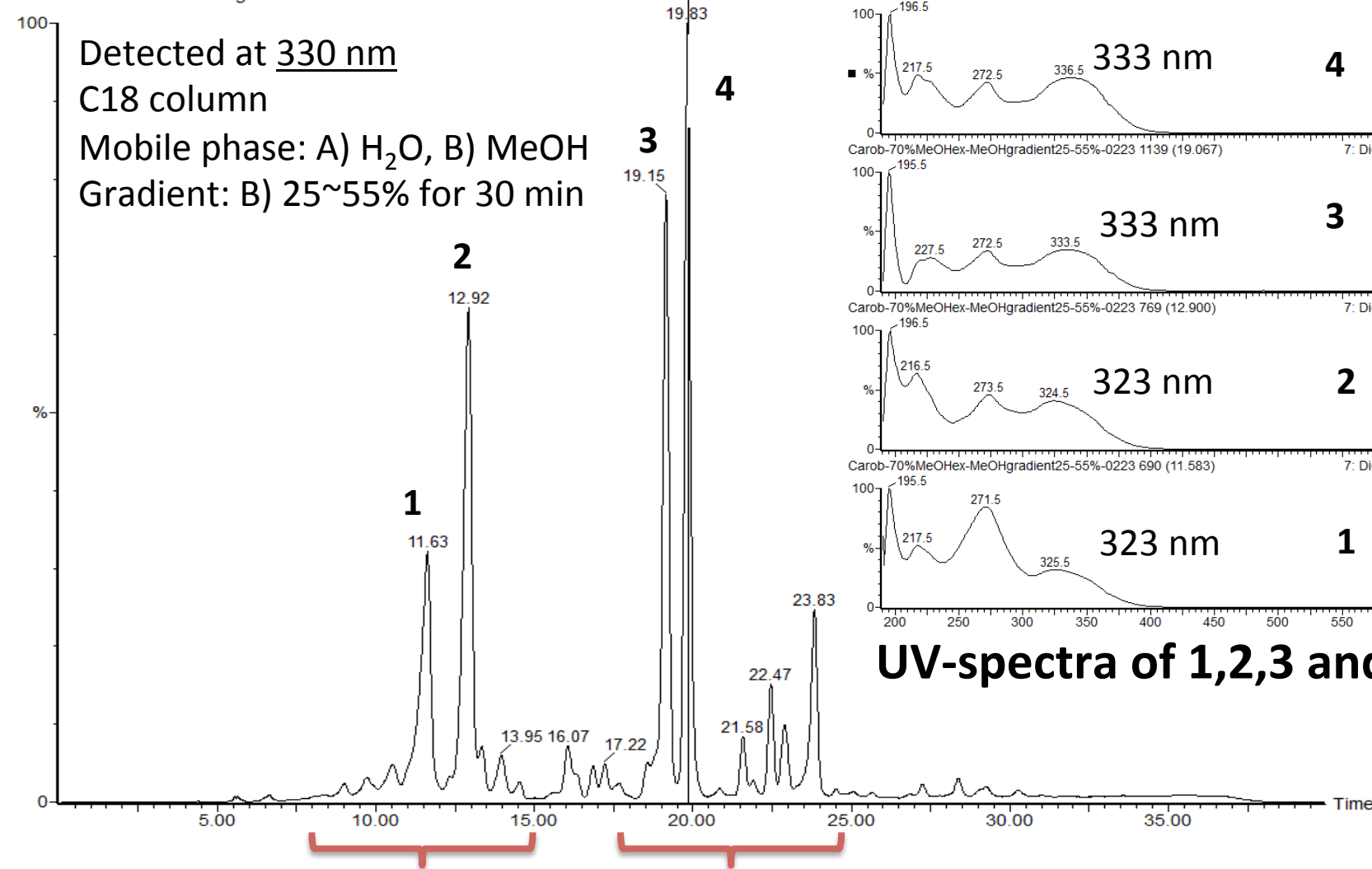
## 色価測定法（9版公定書原案）

本品約0.5gを精密に量り、**70vol%メタノール**を加えて正確に50mLとし、**10分間超音波処理**した後、毎分5000回転で10分間遠心分離を行う。上澄液5mLを正確に量り、**0.01mol/L水酸化ナトリウム溶液**を加えて正確に50mLとし、濁りが認められる場合は、メンブランフィルター(孔径0.20 $\mu$ m)でろ過し、検液とする。



# LC/MS analysis of the extract of carob germ colour

Carob-70%MeOHHex-MeOHgradient25-55%-0223

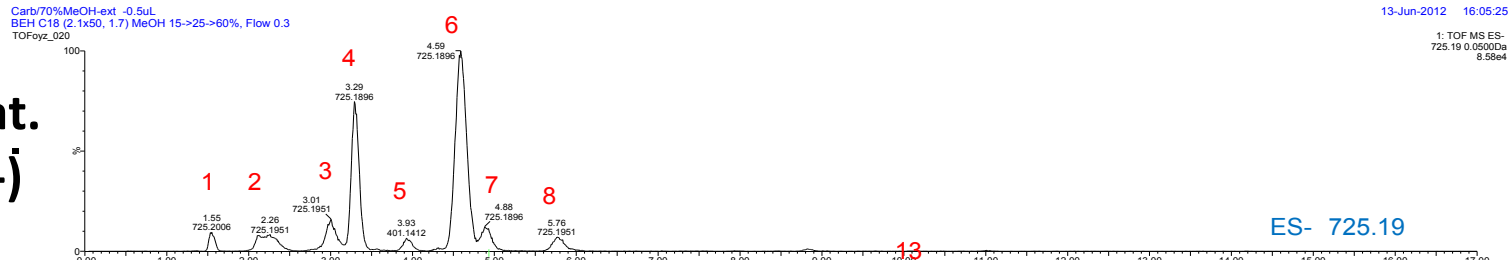


ESI-MS:  $m/z$  725 (-)  $m/z$  563 (-)

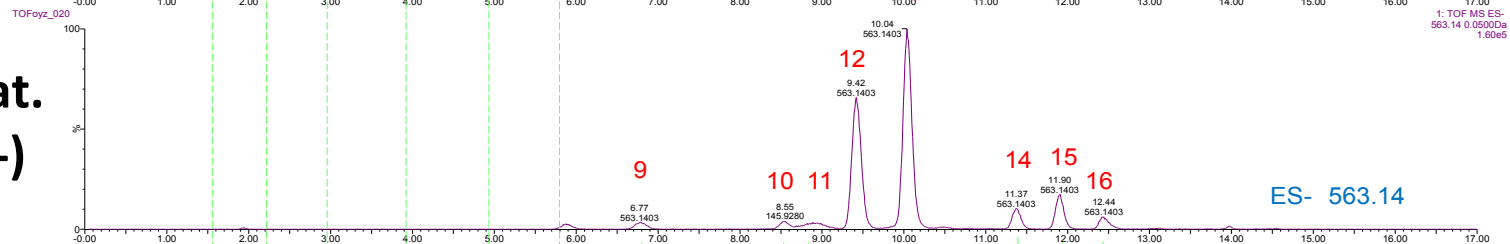


# UPLC/TOFMS analysis of the extract of carob germ color

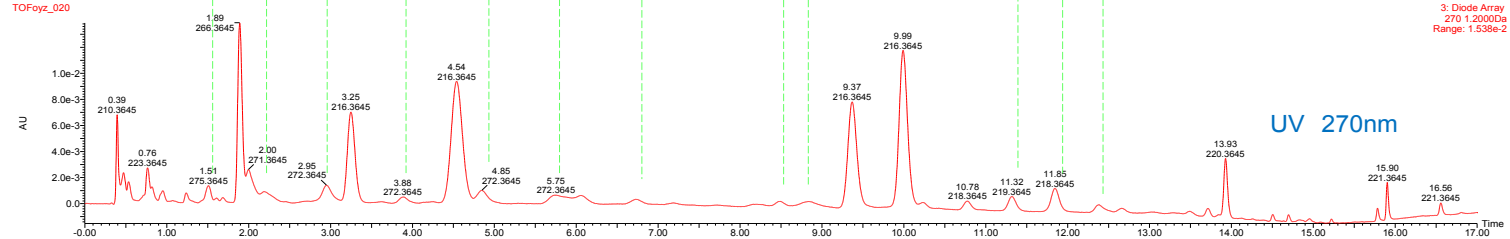
Mass chromat.  
 $m/z$  725.19 (-)



Mass chromat.  
 $m/z$  563.14 (-)

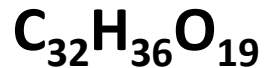


UV 270 nm



Molecular formula

Peaks 1~8



Peaks 9-16



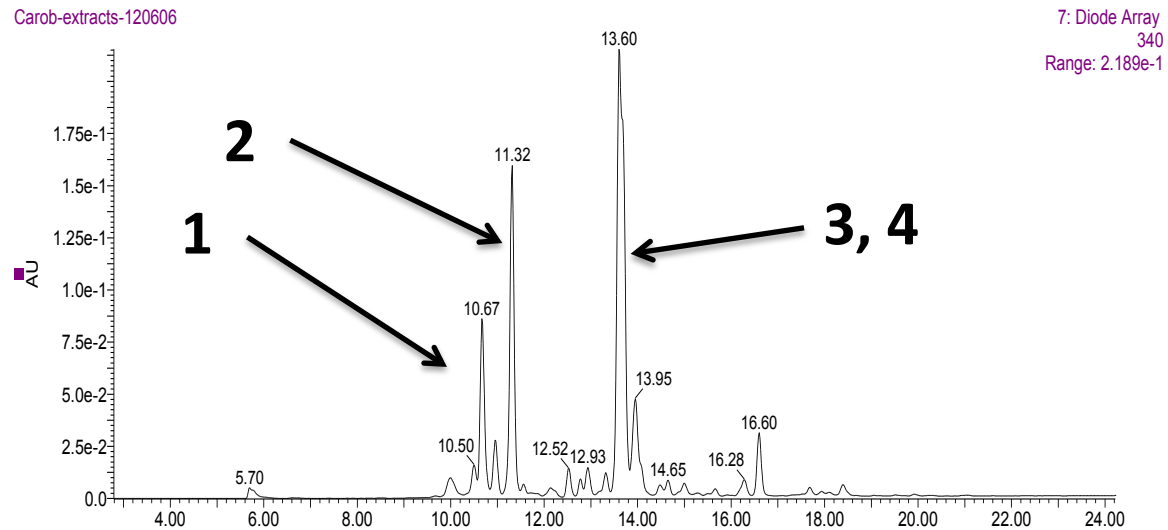
FileName	peak	Rt(min)	Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
TOForz_020 0.5uL-inj	peak1	1.55	725.1914	725.1929	-1.5	-2.1	14.5	300	0.18	83.50	C32 H37 O19
	peak2	2.25	725.1924	725.1929	-0.5	-0.7	14.5	347.5	0	99.95	C32 H37 O19
	peak3	3.01	725.1920	725.1929	-0.9	-1.2	14.5	299.7	0.046	95.50	C32 H37 O19
	peak4	3.29	725.1920	725.1929	-0.9	-1.2	14.5	382	0.089	91.46	C32 H37 O19
	peak5	3.93	725.1918	725.1929	-1.1	-1.5	14.5	318.1	3.5	3.02	C32 H37 O19
	peak6	4.59	725.1928	725.1929	-0.1	-0.1	14.5	333.3	0.381	68.29	C32 H37 O19
	peak7	4.88	725.1923	725.1929	-0.6	-0.8	14.5	324.7	0.013	98.72	C32 H37 O19
	peak8	5.76	725.1917	725.1929	-1.2	-1.7	14.5	321.5	1.004	36.64	C32 H37 O19
TOForz_018 2uL-inj	peak9	6.84	563.1395	563.1401	-0.6	-1.1	13.5	358	0.029	97.13	C26 H27 O14
	peak10	8.45	563.1400	563.1401	-0.1	-0.2	13.5	392.4	0.091	91.33	C26 H27 O14
	peak11	8.89	563.1390	563.1401	-1.1	-2	13.5	410.3	0.023	97.69	C26 H27 O14
	peak12	9.45	563.1400	563.1401	-0.1	-0.2	13.5	388.9	0.581	55.95	C26 H27 O14
	peak13	10.04	563.1401	563.1401	0	0	13.5	479.6	0.831	43.54	C26 H27 O14
	peak14	11.33	563.1390	563.1401	-1.1	-2	13.5	421.3	0	99.97	C26 H27 O14
	peak15	11.90	563.1403	563.1401	0.2	0.4	13.5	414.8	0.054	94.75	C26 H27 O14
	peak16	12.42	563.1396	563.1401	-0.5	-0.9	13.5	415.6	0.006	99.36	C26 H27 O14



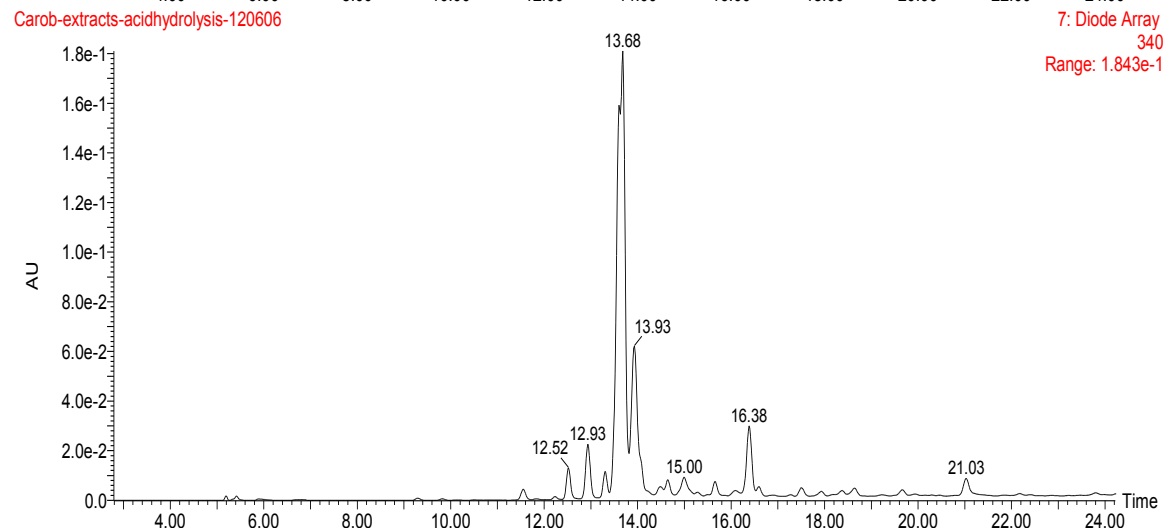
# Identification of **sugar** in flavonoids of carob germ colour

## 1) Acid hydrolysis of the extract

Before Hydrolysis



After Hydrolysis

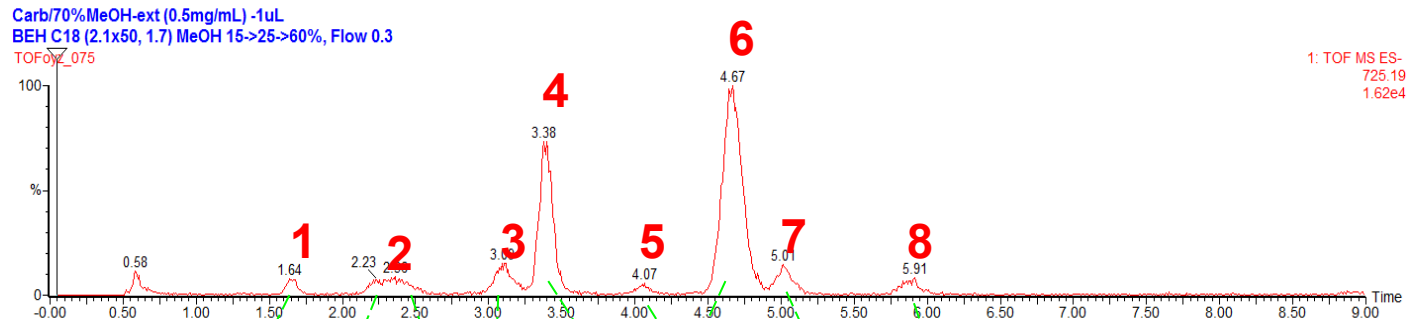


Hydrolysis condition: HCl/MeOH, 1h, 80°C

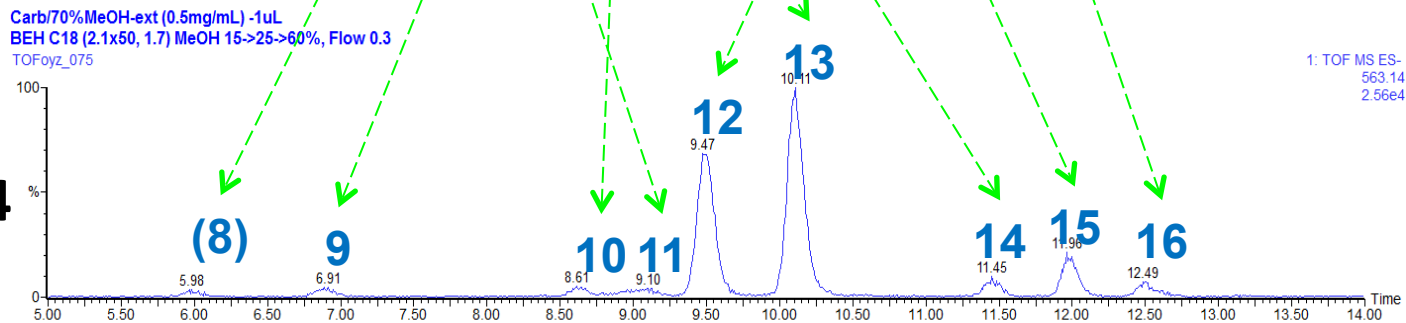
# Identification of sugar in flavonoids of carob germ colour

## 2) $\beta$ -glucosidase treatment of each purified flavonoid

MW = 726



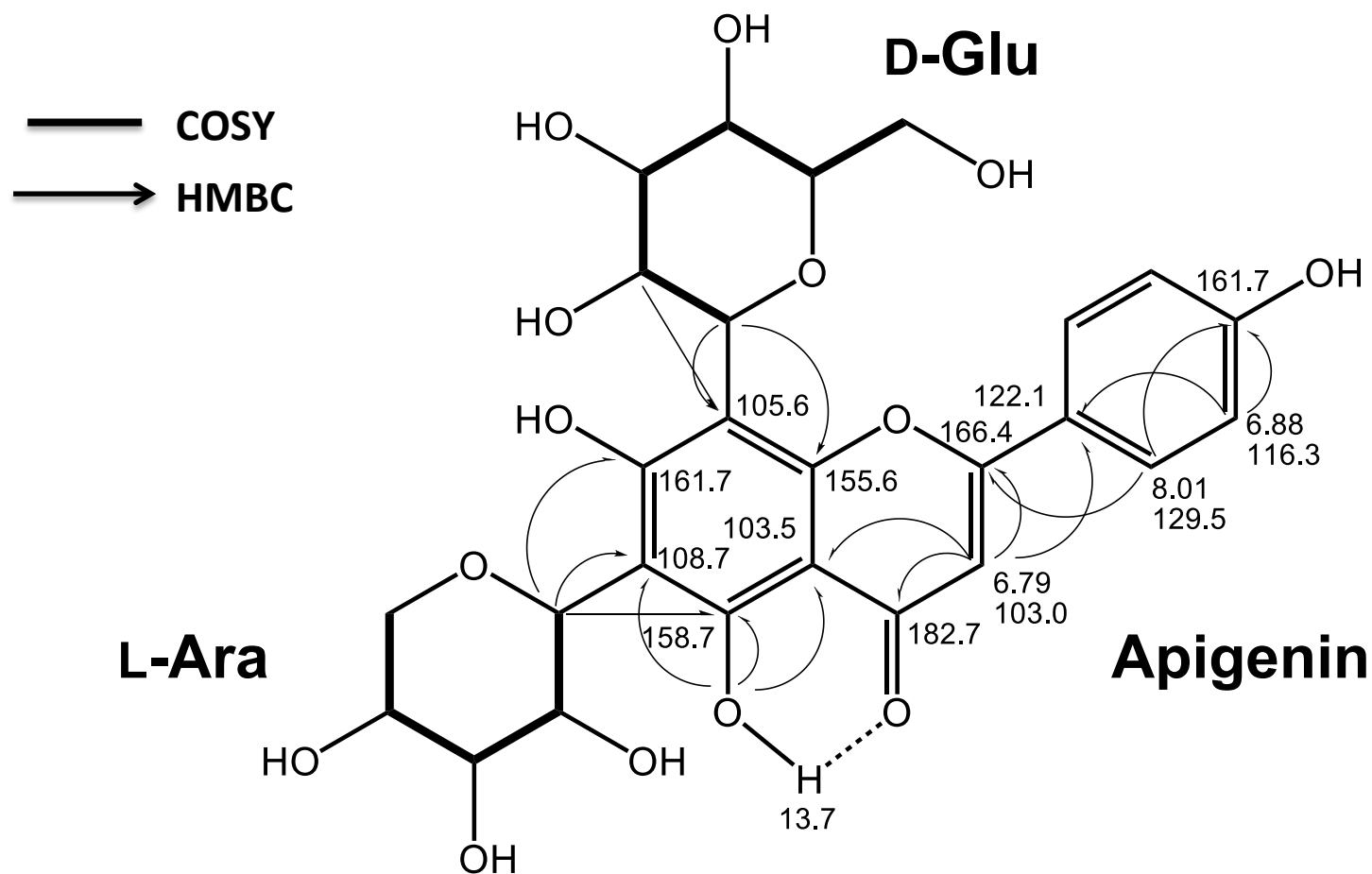
MW = 564



UPLC chromatogram (red: m/z 726.19, blue: m/z 563.14)

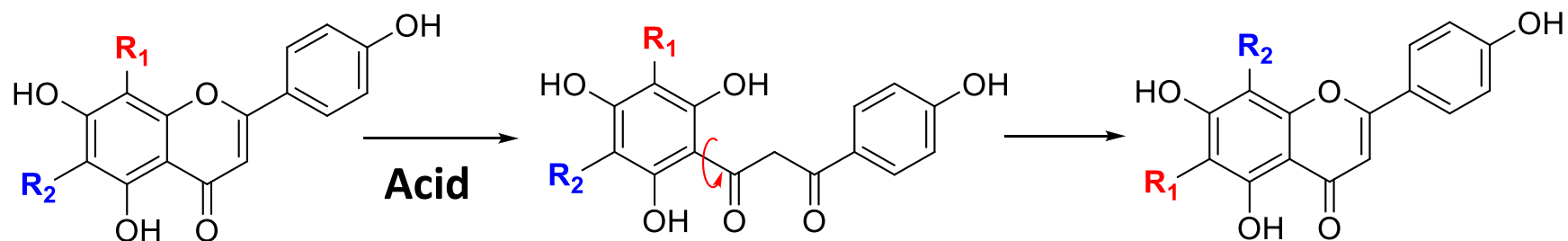
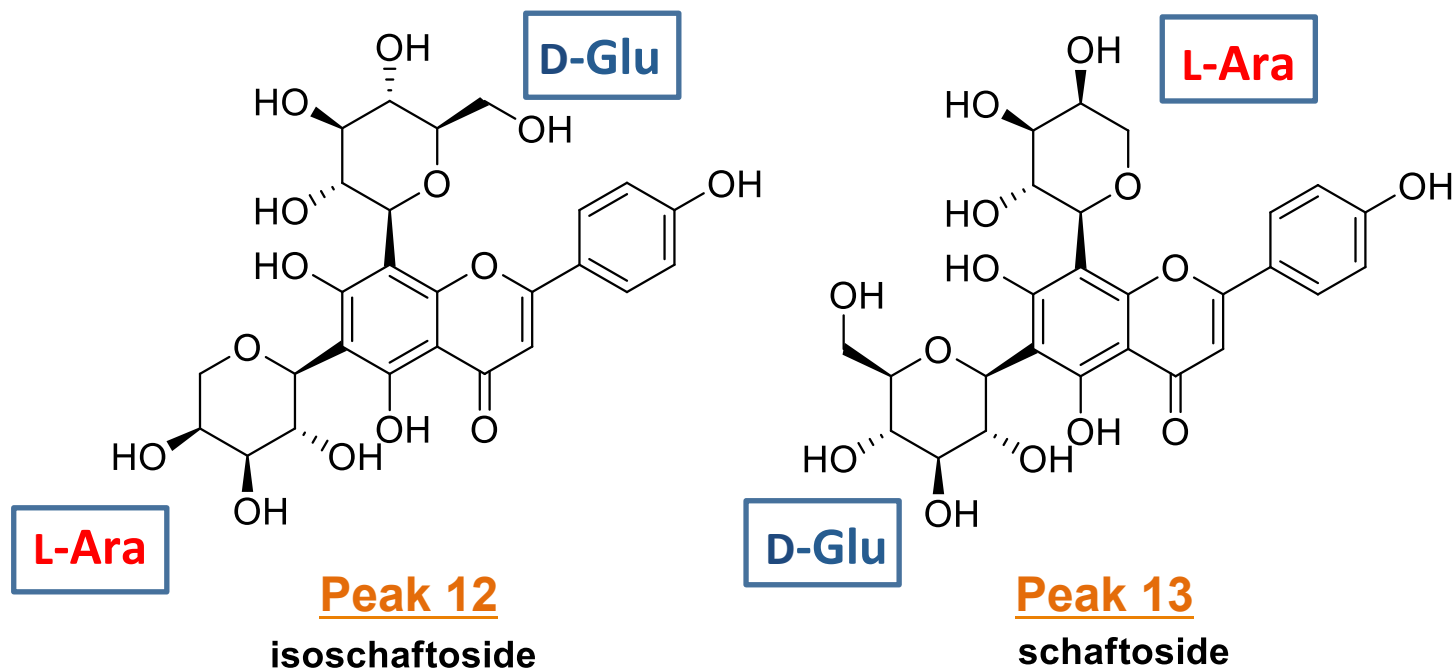
The presence of **D-glucose** was confirmed by **GC-FID** analysis of TMS derivative of each hydrolyzate.

# Structure elucidation of peak 12 by NMR



## Isoschaftoside

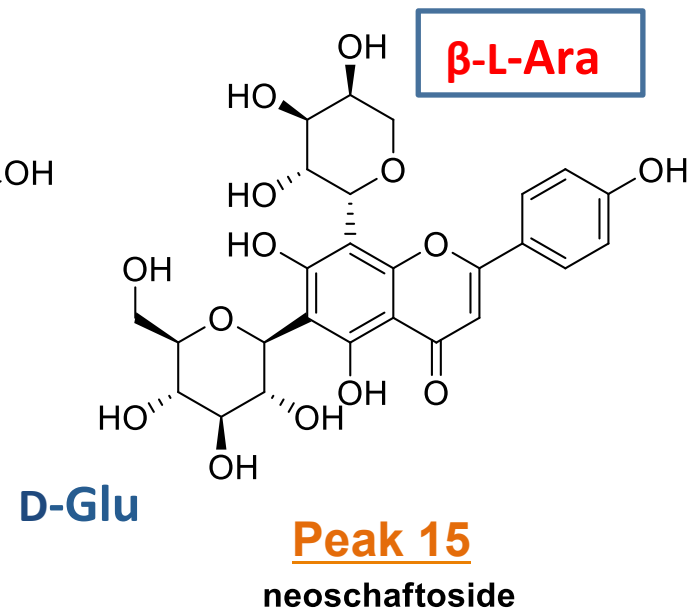
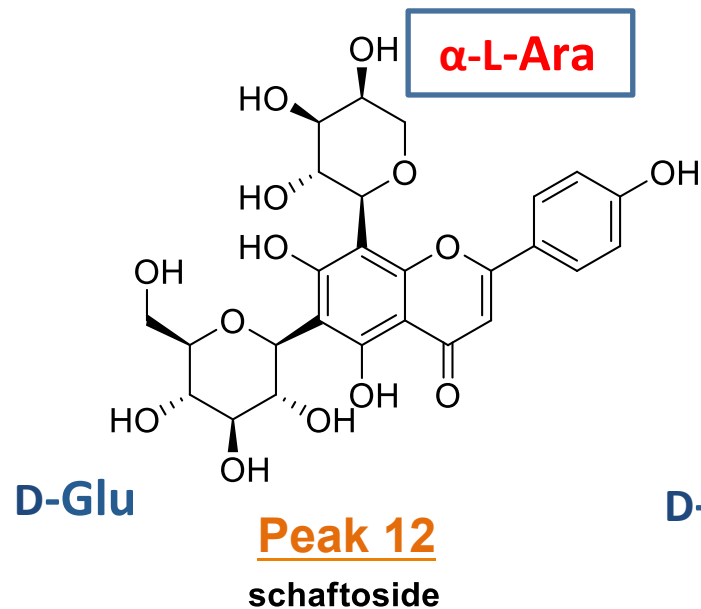
6-C- $\alpha$ -L-arabinosyl-8-C- $\beta$ -D-glucosylapigenin



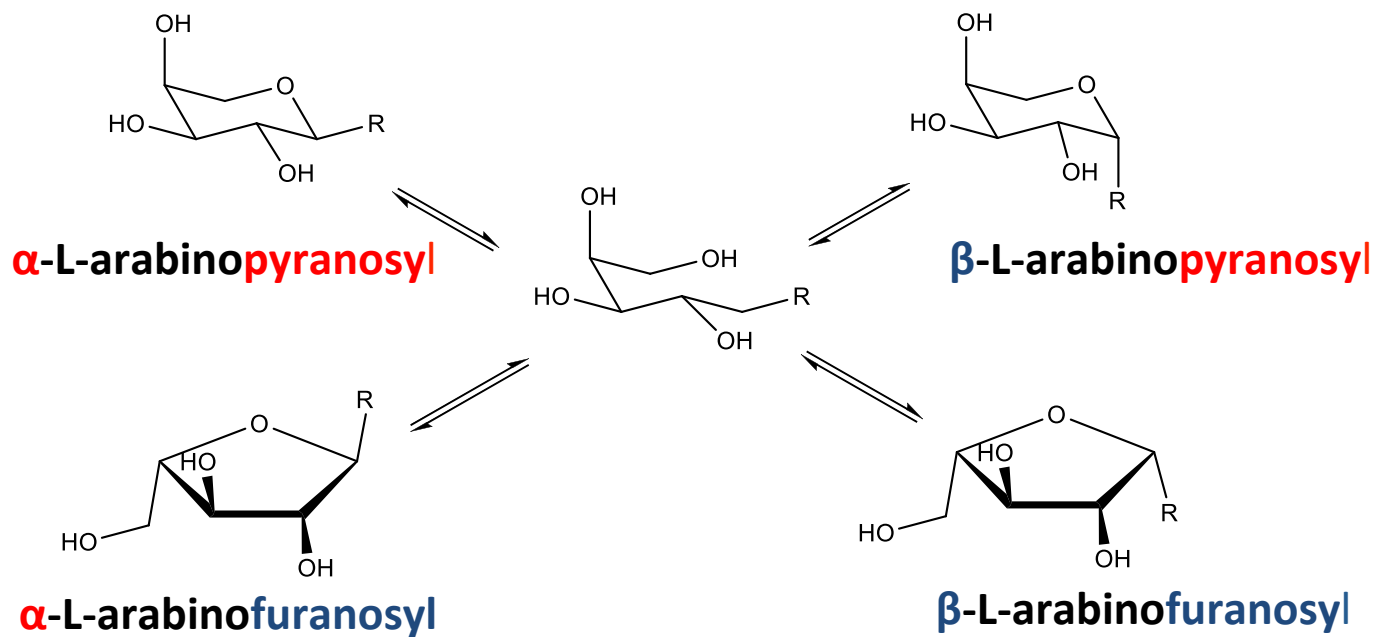
## Wessely-Moser Rearrangement

F. Wessely, G. H. Moser, *Monatsh.* **56**, 97 (1930).

Rearrangement of flavones and flavanones possessing a 5-hydroxyl group, through fission of the heterocyclic ring and reclosure of the intermediate diacylmethanes in the alternate direction:

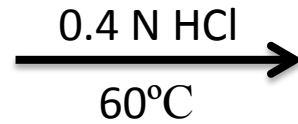
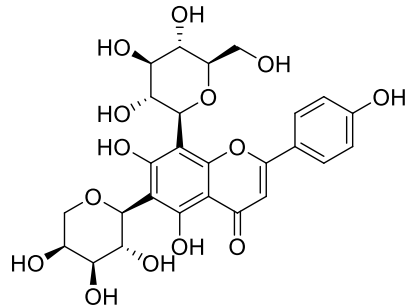


### Isomerization of arabinose moiety (*Phytochem*, 1993)

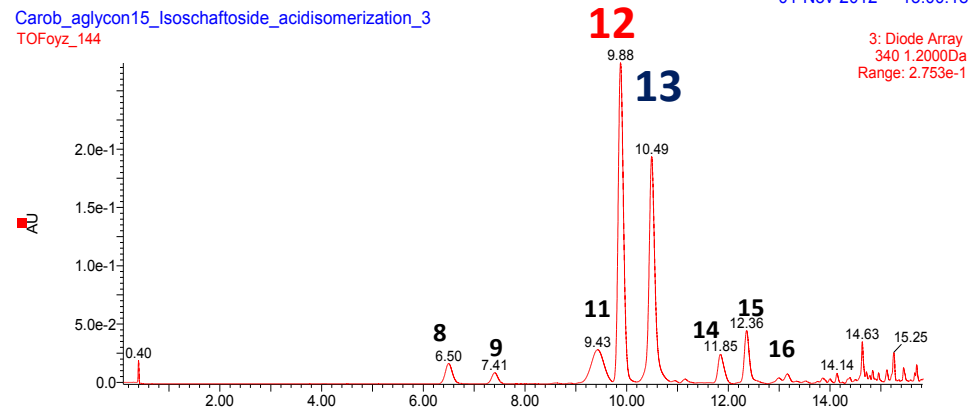


# Isomerization of schaftosides under acid condition

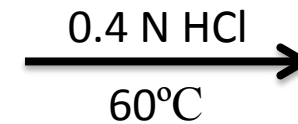
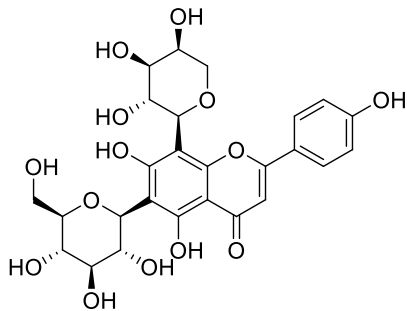
## Peak 12 (Isoschaftoside)



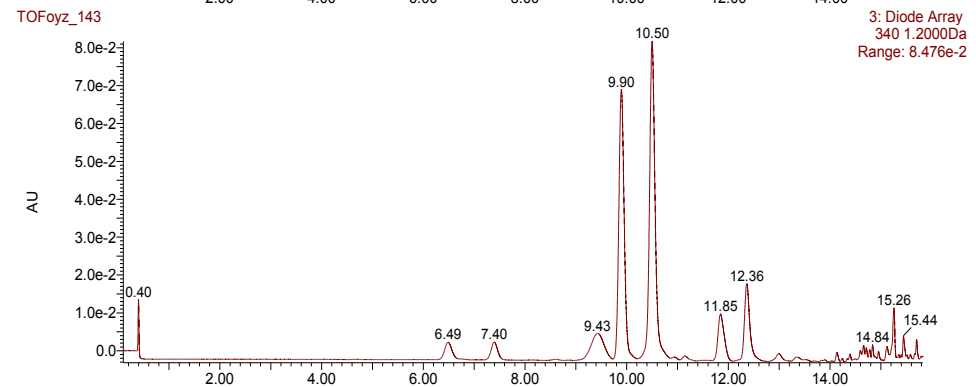
Carob\_aglycon15\_Isoschaftoside\_acidisomerization\_3  
TOFoyz\_144



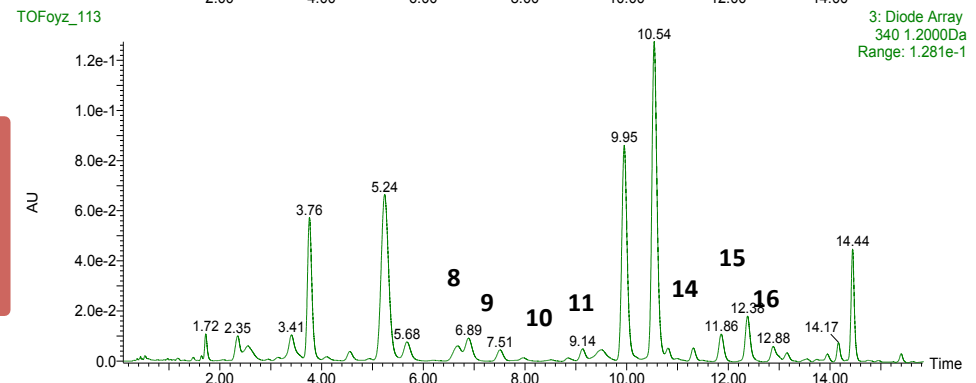
## Peak 13 (Schaftoside)



TOFoyz\_143

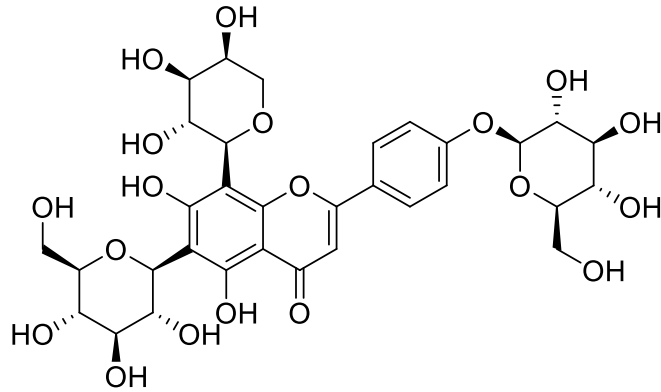


TOFoyz\_113

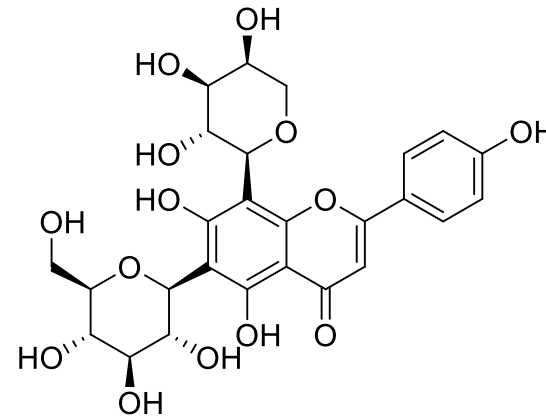


The 70% MeOH extract  
of carob germ color

# Summary: Composition of carob germ colour

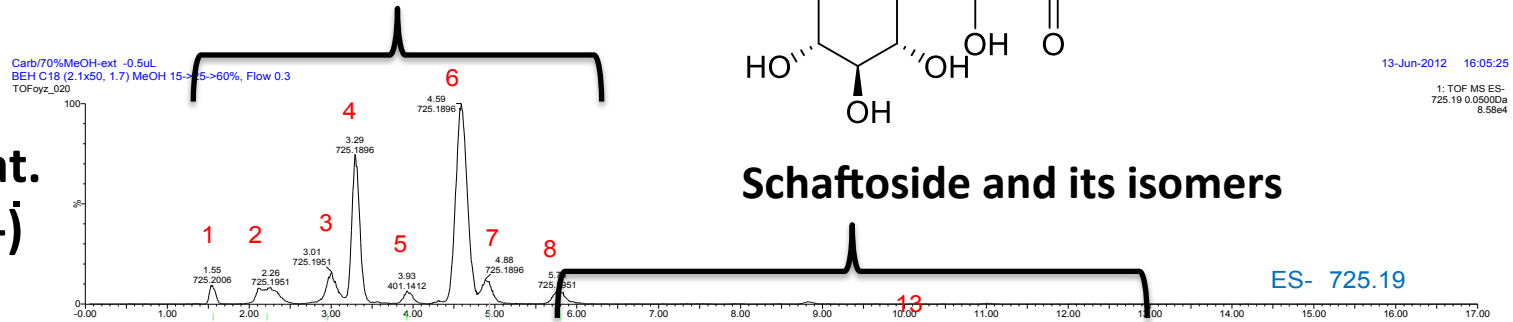


Schaftoside 4'-O-glucoside and its isomers

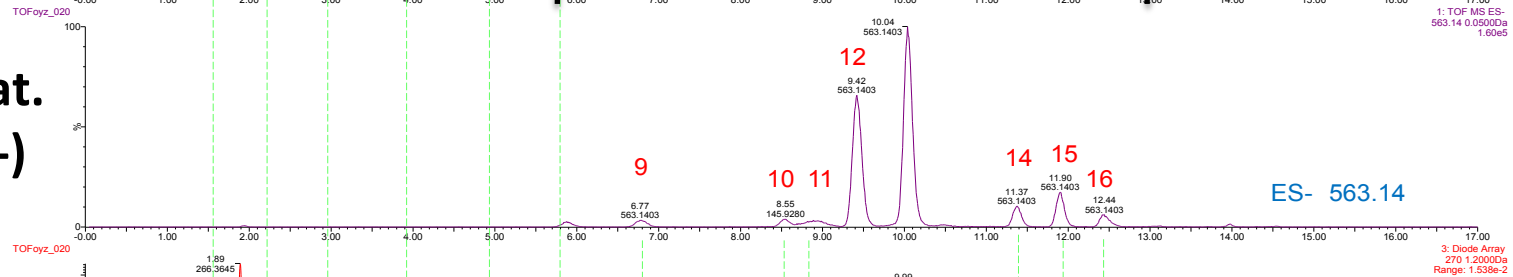


Schaftoside and its isomers

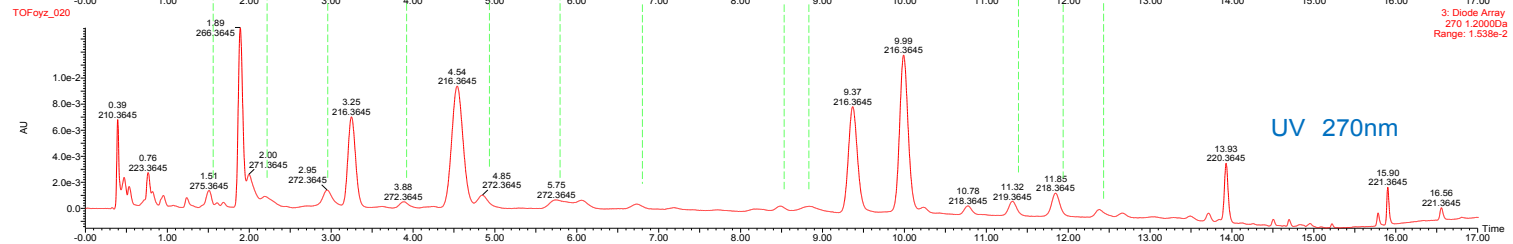
Mass chromat.  
 $m/z$  725.19 (-)



Mass chromat.  
 $m/z$  563.14 (-)



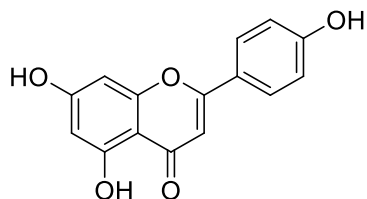
UV 270 nm



UV 270nm

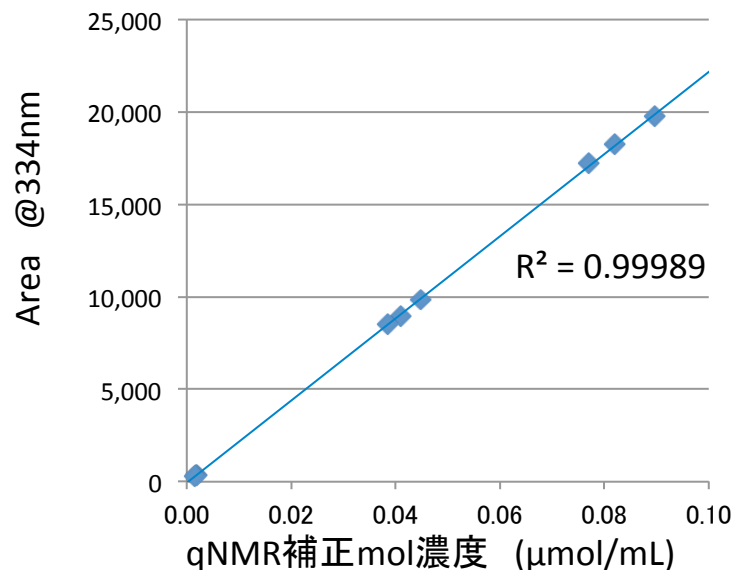


# Quantification of flavones in carob germ colour



**Apigenin (Wako)**  
Purity (qNMR) :92.2%

## • ApigeninのHPLC検量線(334nm)



## • 抽出効率(3回とした)

compounds	Peak area @330nm			
	1st	2nd	3rd	4th
Schaftoside-Glc	1162.4	150.5	11.9	nd
Isoschaftoside-Glc	2225.9	312.0	24.3	nd
Isoschaftoside	1869.6	257.1	18.7	1.2
Schaftoside	2619.9	366.3	31.7	3.6
sum	7877.8	1085.9	86.6	4.9
ratio (%)	87.00	11.99	0.96	0.05

## • HPLC定量 of flavones (n=3)

peak No.	%(w/w)	CV (%)
1	0.015	0.72
2	0.030	0.10
2'	0.027	1.32
2''	0.004	1.72
3	0.040	1.04
schaft-Glc-4	0.137	0.93
4'	0.005	3.21
5	0.011	0.24
5'	0.003	1.76
isoschaft-Glc-6	0.271	0.49
7	0.029	0.35
8	0.025	1.14
sum (A)	<b>0.597</b>	
9	0.011	2.19
10	0.010	1.06
11	0.018	1.55
isoschaft-12	0.170	0.50
schaft-13	0.240	0.57
13'	0.009	1.70
13''	0.002	1.25
14	0.021	0.35
15	0.035	0.58
16	0.014	2.65
sum (B)	<b>0.529</b>	
sum (A + B)	<b>1.126</b>	

**含量: 1.13% (w/w)**

# まとめ

- ・ 「カロブ色素」の色素成分であるフラボン類は、di-C-glucosylapigeninであるschaftosideおよびその構造異性体、さらにそれらの4'-O-glucosideであった。
- ・ フラボン類をapigeninを標品としてHPLC定量した結果、**1.13% (w/w)**含まれていた。

