ノート

天然添加物ホコッシ抽出物の含有成分と食品中の分析法

(平成 14 年 5 月 23 日受理)

千野 誠^{*1,2} 佐藤 恭子^{*1,†} 山崎 壮^{*1} 米谷 民雄^{*1}Constituent of Natural Food Additive Hokosshi Extract
and an Analytical Method for the Additive in FoodsMakoto CHINO^{*1,2}, Kyoko SATO^{*1,†}, Takeshi YAMAZAKI^{*1} and Tamio MAITANI^{*1}(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;*²Nihon University College of Bioresource Sciences: 1866, Kameino, Fujisawa,
Kanagawa, 252-8510, Japan; † Corresponding author)

Hokosshi extract is obtained by ethanol extraction from the seeds of hokosshi (*Psoralea corylifolia*), which is used as a Chinese medicine. The constituents of hokosshi extract were analyzed. The main constituent was isolated using column chromatography, and identified as bakuchiol by TLC, LC/MS and NMR. Bavachinin A was also detected. In order to prepare a marker substance for hokosshi extract, bakuchiol was isolated from seeds of hokosshi using Sep-Pak cartridges. An analytical method for hokosshi extract in foods based on detection of bakuchiol was developed. Bakuchiol was extracted from food with 60 vol% ethanol. The extract was cleaned up using a Sep-Pak plus C18 cartridge, and bakuchiol was determined by HPLC. Seasoning and juice were spiked with hokosshi extract at 500 $\mu\text{g/g}$ and analyzed by the proposed method. The recoveries of bakuchiol were 72~99%. The detection limit for the assay was 25 $\mu\text{g/g}$.

(Received May 23, 2002)

Key words: ホコッシ抽出物 hokosshi extract; 天然添加物 natural food additive; バクチオール bakuchiol; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒言

日持向上剤は、保存料ほどの保存効果は示さないが、数時間又は数日といった短期間の腐敗・変敗を防ぐために使用される添加物であり、製造用剤に含まれる。消費者の保存料敬遠傾向を受けて、日持向上剤が増加傾向を見せている。しかし、その成分組成が明らかにされていない品目や食品中からの分析法が確立されていない品目も多い。

天然添加物のホコッシ抽出物は、マメ科ホコッシ (*Psoralea corylifolia* O. KZE.) の種子より、エタノールで抽出して得られたもので、主成分はバクチオール (bakuchiol) とされている¹⁾。細菌、特にグラム陽性菌の静菌効果があり、キレート剤と併用するとグラム陰性菌にも静菌効果を示すが、酵母には効果が少なく、また耐熱性にやや欠けるといわれる²⁾。ホコッシ抽出物の用途は、めんつゆ、浅漬け漬物などの日持向上剤とされ³⁾、食品保存料⁴⁾や健康食品⁵⁾としての特許出願がみられる。

食品中の天然添加物を分析する際に問題となるのが、標品の入手である。ホコッシ抽出物の主成分 bakuchiol の市販試薬製品はなく、入手は困難である。そこで、本研究ではホコッシ抽出物から bakuchiol を単離し同定を行った。また、漢方薬として入手可能なホコッシ種子 (補骨脂) からの簡便な bakuchiol の精製法を検討し、更に、その精製法を応用し、bakuchiol を指標とした食品中のホコッシ抽出物の分析法を確立したので報告する。

実験方法

1. 試料

ホコッシ種子及びホコッシ抽出物 1 製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した。食品は世田谷区内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。

2. 試薬

Angelicin, psoralen, methoxsalen, bavachinin A はフナコシ(株)より購入した。クロロホルム-*d* は Isotec Inc. 製 99.96 atom% *d* をを用いた。分取用シリカゲルには、関東化学(株)製 Silica Gel 60N をを用いた。固相抽出用カートリッジは、日本ウォーターズ(株)製 Sep-Pak Plus のシリカ及び C18 をを用いた。その他の試薬は、和光

† 連絡先

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野 1-18-1*² 日本大学生物資源科学部: 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

純薬工業(株)製の特級試薬を用いた。

3. 装置

HPLC 装置:ポンプ LC-10 AD, システムコントローラー SCL-10A, 紫外可視検出器 SPD-10AV, デガッサー DGU-3A, カラム恒温槽 CTO-6A, データ処理装置 C-R7 Aplus ((株)島津製作所製)。

液体クロマトグラフ/質量分析計: API-electrospray LC/MS system (HPLC 装置 HP 1090 series II, エレクトロスプレー HP 59987A, 質量分析計 HP 5989B, Hewlett Packard 社製)

分取 HPLC 装置: ポンプ LC-6A ((株)島津製作所製)

NMR 装置: JNM-A500 (日本電子(株)製)

4. HPLC 条件

1) Bakuchiol の分析

カラム: TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mm i.d.×250 mm, 東ソー(株)製), カラム温度: 35℃, 移動相: メタノールと水を用いた以下のグラジエント条件 0~15 分, 85~95 vol% メタノール (直線グラジエント), 流速: 1.0 mL/min, 検出波長: 263 nm

2) 他の含有成分の分析

移動相のグラジエント条件 (0~5 分, 60 vol% メタノール; 5~20 分, 60~90 vol% メタノール (直線グラジエント)) のほかは, 1) と同様とした。

5. LC/ESI-MS 分析条件

1) HPLC 部

カラム: TSK-GEL ODS-80Ts QA (2.0 mm i.d.×150 mm, 東ソー(株)製), カラム温度: 35℃, 移動相: メタノールと水を用いた以下のグラジエント条件で分析した。0~15 分, 60~90 vol% メタノール (直線グラジエント); 15~20 分, 90~100 vol% メタノール (直線グラジエント), 流速: 0.2 mL/min, 検出スペクトル測定波長: 221~351 nm

2) MS 部

イオン化法: 大気圧イオン化法 (エレクトロスプレー), モード: ネガティブ及びポジティブモード

6. 分取 HPLC 条件

カラム: CPO-HS-221-20 (22 mm i.d.×100 mm, (株)草野科学製), カラム温度: 室温, 流速: 0.8 mL/min, 移動相: メタノール-水 (85:15)

7. TLC 条件

TLC プレート: Kieselgel 60F²⁵⁴ (メルク社製), 展開液: クロロホルム-酢酸エチル (95:5), 発色液: 10 vol% 硫酸メタノール溶液。発色液を噴霧後, ホットプレート上で加熱した。

8. Bakuchiol の単離

ホコッシ抽出物 (20.0 g) を減圧濃縮し, その残留物を *n*-ヘキサン 50 mL で超音波抽出 (3 回) 後, 減圧濃縮しヘキサン抽出物 (2.8 g) を得た。そのヘキサン抽出物 1.2 g をシリカゲルカラム (28 mm i.d.×300 mm) に負荷し, *n*-ヘキサン 180 mL で洗浄後, *n*-ヘキサン-酢酸エチル

(9:1) で溶出した。TLC で bakuchiol の確認された画分を集め, 減圧乾固後, メタノールに溶解し, ODS カラムを用いた分取 HPLC により, 0.3 g の bakuchiol を単離した。

9. ホコッシ種子からの bakuchiol の調製

ホコッシ種子 3 g を *n*-ヘキサン中で軽く破碎し, 更に *n*-ヘキサンを加えて約 5 分間超音波抽出し, ろ紙でろ過後, *n*-ヘキサンで 10 mL とした。このヘキサン抽出液 1 mL を, 6 mL の *n*-ヘキサンであらかじめコンディショニングした Sep-Pak シリカカートリッジに負荷し, 6 mL の *n*-ヘキサンと 8 mL の *n*-ヘキサン-酢酸エチル (98:2) で洗浄後, 4 mL の *n*-ヘキサン-酢酸エチル (95:5) で溶出した。溶出液を減圧乾固後, 3 mL の 60 vol% エタノールに溶解し, あらかじめ 3 mL の 60 vol% エタノールでコンディショニングした Sep-Pak C18 カートリッジに負荷し, 4 mL の 70 vol% エタノールで洗浄後, 6 mL の 85 vol% エタノールで溶出した。得られた溶出液を減圧乾固し, bakuchiol (5 mg) を得た。

10. 食品中のホコッシ抽出物分析用試験液の調製

1) 液体試料

試料は, 焼き肉のたれ, 浅漬けの素, つゆの素, オレンジジュースを用いた。試料 5.0 g を 60 vol% エタノールで 50 mL にメスアップし, ろ紙でろ過した。ろ液 1 mL をあらかじめ 3 mL の 60 vol% エタノールでコンディショニングした Sep-Pak C18 カートリッジに負荷し, 70 vol% エタノール 4 mL で洗浄し, 85 vol% エタノール 6 mL で溶出し, HPLC 用試料液とした。

2) 粉末試料

試料は, 浅漬けの素 (粉末) を用いた。試料 5.0 g に 60 vol% エタノール 25 mL を加え, 超音波処理し, 遠心分離後, 上清を採った。残さに 60 vol% エタノール 20 mL を加え, 同様に操作し, 上清を合わせ, 60 vol% エタノールで 50 mL とした。ろ過後, 1) と同様にカートリッジ精製し, HPLC 用試料液とした。

結果及び考察

1. 主成分の単離精製及び構造決定

ホコッシ抽出物の減圧濃縮による残留物を *n*-ヘキサンで抽出し, 得られた抽出物について, TLC を行ったところ, bakuchiol の特徴 (10 vol% 硫酸メタノール溶液を噴霧後, 加熱により黄緑色を示す⁶⁾) を持つスポットが *R_f* 0.62 に顕著に認められた。ほかにスポットが 2~3 観察されが, その面積は bakuchiol のスポットに比べ著しく小さかったことから, ヘキサン抽出物の主成分は bakuchiol であると推定された。

次に, 主成分を bakuchiol と同定するために, 上記ヘキサン抽出物から, 主成分の単離精製を行った。得られた主成分の極大吸収波長は 263 nm であり, HPLC クロマトグラム (検出波長 263 nm) 上において 1 ピークが観察され, LC/ESI-MS (ネガティブモード) で *m/z* 255 に

Fig. 1. Structures of bakuchiol and bavachinin A

Table 1. Recoveries of Hokosshi Extract Added to Food-stuffs

Sample	Recovery (%)
Meat marinade sauce 1 (Yakiniku no tare)	82±1.8
Meat marinade sauce 2 (Yakiniku no tare, ginger)	99±0.8
Grilled chicken sauce (Yakitori no tare)	94±0.4
Cooking sauce for pickles 1 (Asazuke no moto)	99±5.6
Cooking sauce for pickles 2 (Asazuke no moto, powder)	72±3.9
Concentrated sauce dip (Tsuyu no moto)	97±1.0
Orange juice	97±2.2

Values are mean±SD ($n=3$)

擬分子イオンピークが観察された。 $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った結果, bakuchiol の文献値⁶⁾とも一致し, 主成分を bakuchiol (分子量 256, Fig. 1) と同定した。

2. 他の含有成分の同定

ホコッシ抽出物の原料であるホコッシ種子は, 漢方薬として用いられており^{7, 8)}, 含有成分に関しては 30 種を超える化合物の存在が明らかとなっている⁹⁾。そこで, それらのうち, 試薬として入手可能であった angelicin, psoralen, methoxsalen, bavachinin A を標品として, ホコッシ抽出物中の成分を HPLC 及び LC/ESI-MS により検討したところ, bavachinin A (Fig. 1) は検出・同定されたが, 他の化合物は観察されなかった。

3. ホコッシ抽出物中の bakuchiol の定量

精製した bakuchiol を用いて作成した検量線は, 0.5~5.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性を示し, また, その検出限界は 0.12 $\mu\text{g/mL}$ であった。入手したホコッシ抽出物の bakuchiol 含量を求めたところ, 19% であった。ホコッシ抽出物は, ホコッシ種子よりエタノールで抽出して得られたものであり, エタノールを含有している。入手したホコッシ抽出物の乾燥減量 (105°C, 2 時間) は 52% であったことから, エタノールなどの揮発性成分を除いたホコッシ抽出物中の bakuchiol 含量は約 40% と高く, bakuchiol は食品中のホコッシ抽出物の分析用指標として最適であると考えられた。

4. ホコッシ種子からの bakuchiol の調製

ホコッシ抽出物の主成分 bakuchiol は試薬として市販されていない。一方, ホコッシ種子は, 漢方薬である^{7, 8)}ため, 入手が容易である。そこで, 種子からの bakuchiol

Fig. 2. HPLC chromatograms of the extracts from cooking sauce for pickles and sauce spiked with the hokosshi extract
(A): cooking sauce for pickles
(B): cooking sauce for pickles (with 500 ppm of the hokosshi extract)
a: peak of bakuchiol

の簡便な調製法についても検討した。

ホコッシ種子からの bakuchiol の抽出溶剤として, ジエチルエーテル, アセトン, メタノール, n -ヘキサンを検討した。これらの溶剤にホコッシ種子を 15~16 時間浸し, 抽出を行い, その bakuchiol 抽出量を HPLC で比較した。

Bakuchiol の抽出力はジエチルエーテル>アセトン>メタノール> n -ヘキサンの順であったが, bakuchiol 以外の成分の抽出比率は, n -ヘキサンが少なかった。そこで, n -ヘキサンでの抽出効率を上げるため, ホコッシを少量の n -ヘキサン中で軽くつぶしてから抽出を行ったところ, 他の成分は少なく, bakuchiol 含量の高い抽出液が得られた。この抽出液を Sep-Pak カートリッジで処理し, 得られた抽出物をホコッシ抽出物より単離した bakuchiol と HPLC 及び LC/ESI-MS で比較検討した結果, 食品中ホコッシ抽出物分析の標品となりうるものと思われた。

5. 添加回収実験

ホコッシ種子からの bakuchiol の調製法を応用し, 食品中のホコッシ抽出物の分析法を作成した。焼き肉のたれ (3 製品, 液体), 浅漬の素 (2 製品, 液体及び粉末), 濃縮つゆ (1 製品, 液体), 果汁飲料 (1 製品) を用いて添加回収実験を行った。食品へのホコッシ抽出物添加量は, 公開特許公報⁴⁾の処方参考に, bakuchiol として約 100 $\mu\text{g/g}$ になるよう, 500 $\mu\text{g/g}$ とした。実験方法 10. 1) に従い bakuchiol の回収率を求めたところ, 粉末の浅漬の素で 10% 前後の回収率しか得られなかった。粉末食品での回収率の低下は, 抽出溶剤の浸透が不十分であったためと予測された。そこで, 前処理について検討し, 実験方法 10. 2) に示したように, 超音波抽出 (5 分) と遠心分離 (3,000 rpm, 5 分) を 2 回行うことで, 回収率を 72% に改善できた。

ホコッシ抽出物の添加回収率を Table 1 に示す。焼き肉のたれ 1 製品で 82%, 粉末浅漬けの素 1 製品で 72% とやや低い値を示したが, 他の食品での回収率は 94% 以上であった。Fig. 2 にホコッシ抽出物を浅漬けの素 (液体) に 500 $\mu\text{g/g}$ 添加したもの (B) と無添加のもの (A) のクロマトグラムを示した。いずれの食品においても, 妨害ピークは観察されなかった。また, 本法における定量限界は, 試料当たり bakuchiol として 25 $\mu\text{g/g}$ であった。この結果から, 本法により bakuchiol を指標として, 食品へのホコッシ抽出物の使用が確認できると考えられた。なお, 今回用いた食品からは bakuchiol は検出されなかった。

ま と め

天然添加物ホコッシ抽出物について, その含有成分及び食品に使用された場合の分析法について検討した。

1. ホコッシ抽出物の主成分をシリカゲルカラム及び ODS カラムで分取し, TLC, LC/MS, NMR などから bakuchiol と同定した。

2. ホコッシ抽出物の bakuchiol 以外の成分として, bavachinin A が検出された。

3. ホコッシ抽出物分析の指標とするため, Sep-Pak カートリッジを用いて, ホコッシ種子からの bakuchiol の調製法を検討した。

4. ホコッシ種子からの bakuchiol の調製法を応用し, Sep-Pak C18 カートリッジを用いて食品中のホコッシ抽出物の分析法を作成した。市販食品にホコッシ抽出物を添

加し, bakuchiol を指標として求めた回収率は 72~99% であり, その検出限界は 25 $\mu\text{g/g}$ あった。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知“既存添加物名簿収載品目リスト”平成 8 年 5 月 23 日, 衛化第 56 号 (1996).
- 2) Hidaka, T., Yukawa, M., “Shokuhin Tenkabutsu Jiten”, Tokyo, Shokuhinkagaku Shinbunsha, 1997, p. 317-318. (ISBN4-916143-01-9)
- 3) Toyama, A., “Tennenbutsu Binran, 14 Ed.”, Osaka, Syokuhin to Kagakusha, 1998, p. 283. (ISBN4-87994-062-3)
- 4) Chikuyama, R., Sawa, T., Miura, E., Japan Kokai Tokkyo Koho, H05-15355 (Jan. 26, 1993).
- 5) Chikuyama, R., Suzuki, A., Takimoto, Y., Japan Kokai Tokkyo Koho, H10-215813 (Aug. 18, 1998).
- 6) Kubo, M., Dohi, T., Odani, T. Tanaka, H., Iwamura, J., Cytotoxicity of corylifoliae fructus. I. Isolation of the effective compound and the cytotoxicity. Yakugaku Zasshi (Journal of the Pharmaceutical Society of Japan), **109**, 926-931 (1989).
- 7) Nanba, T., “Genshoku Wakanyaku Zukan, 1st Vol.”, Osaka, Hoikusha, 1986, p. 225-226. (ISBN4-586-30056-6)
- 8) Genshoku Chugoku Honzo Zukan Henshuiinkai eds., “Genshoku Chugoku Honzo Zukan 4”, Yukisha, 1983, p. 208-209. (ISBN4-8418-1015-3)
- 9) Ji, L., Xu, Z., Review of constituents in fruits of *Psoralea corylifolia* L. Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih, **20**, 120-122 (1995).