

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：82514

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350176

研究課題名(和文) 軽元素安定同位体比を指針とするクルクミン類の由来識別

研究課題名(英文) Identification of curcumin derived from natural turmeric and organic synthetic by stable isotopic analysis

研究代表者

王 曉水 (WANG, XIAOSHUI)

公益財団法人日本分析センター・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：10544273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：天然由来品と合成品は同様な化学構造を有するため、形態学的な外観検査や食品添加物の規格に適用される試験法では両者の測定値に有意差を示さない。本研究では、植物ウコンから抽出して得られた天然クルクミン及び有機合成によって製造された合成クルクミンの軽元素安定同位体比構成の解析を実施し、天然/合成品に至る元素構成の特徴から製造由来の識別可能性について検討した。天然クルクミン及び合成クルクミンの同位体分析の結果により、水素安定同位体が製造由来の指標元素として有効であることが確認された。また、ウコンの同位体比において、窒素・酸素同位体結果を用いて国産と外国産ウコンの産地識別の可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：For the products derived from different origins as organic synthesis and naturally extraction with an identical chemical structure, it is disable to distinguish their origin depending on the traditional test, such as morphological appearance and analytical standard applied to the food additive. In this research work, stable isotopic composition of curcumin derived from extraction of natural turmeric and organic synthesis of chemicals were analyzed to evaluate the possibility of original identification. As the results, nitrogen and oxygen isotope was presented difference to the turmeric from domestic or foreign origin. In addition, hydrogen stable isotope is considered as an effective approach to the manufacture traceability for curcumin with different origin.

研究分野：食品化学

キーワード：クルクミン 製造由来識別 安定同位体

### 1. 研究開始当初の背景

ウコンは天然食品添加物や香辛料として昔より汎用されている食品素材である。ウコンの薬効成分は、三種類のクルクミン類、すなわちクルクミン、デメトキシクルクミン、およびビスデメトキシクルクミンから構成されており、その生理活性評価や動物実験もクルクミンを中心に研究が実施されている。近年、クルクミンの抗酸化作用、抗炎症作用、および抗がん作用が報告され、機能性天然素材としての需要が急速に伸びている。一方、石油資源由来の元素源を元にする化学合成法として、クルクミン類の化学合成方法が報告された<sup>1</sup>。合成クルクミンは、従来の植物（栽培されたウコン）から抽出した天然品と同様で、サプリメント素材として流通している現状がある。健康食品のトレーサビリティ（追跡可能性）は、その製造由来のリスク管理の強化や、健康食品表示の信頼性を確保するため、異なる製造由来のクルクミン原料を識別する必要がある。また、商品の不正表示や加工途中での不当混入など違法行為を防止する観点から、簡単かつ信頼できる製造由来識別技術の開発は極めて重要である。

一方、自然生態系において、天然に存在する生体物質は、物理化学的、生物学的変化の履歴によって定める安定同位体比フィンガープリントを持っている。H、C、N、Oの同位体比は生命活動の中で、各化合物に特有の生物化学的プロセス（合成・代謝・分解など）と密接にリンクした情報が得られるという特徴があるため、個体ごとに固有の値となる。従って、軽元素安定同位体比分析は、農産物原産地の識別および栽培履歴の判別<sup>2</sup>、海洋生物の栄養段階の推定<sup>3</sup>、及び陸域・海洋生態系での物質循環解析研究等に用いられている。

### 2. 研究の目的

本研究は、植物ウコンに由来する天然クルクミン及び有機合成によって製造された合成クルクミンの軽元素構成の特徴を安定同位体比解析により解明し、天然/合成クルクミンを安定同位体比より識別可能とすることを目的としている。また、天然物特有の構成要因を検証し、クルクミンの安定同位体比の産地及び季節ごとの差異を考察することにより、天然/合成クルクミンの判別指標元素の有効性・再現性について明確することを目指した。

### 3. 研究の方法

2014年から2015年にかけて、国産ウコ

ン（産地：沖縄、鹿児島、三重、京都、山梨、東京、群馬、千葉、栃木）26検体、外国産ウコン（産地：インド、ベトナム、中国、マレーシア、ミャンマー）12検体を収集した。また、産地が確かな検体を調達するため、大宜村（沖縄県・沖縄有機ファーム）、福知山市（京都府・株式会社ダイアスポラ）、藤岡市（群馬県・個人栽培）の栽培地においてウコン、栽培土壌、灌漑用水をサンプリングした。

天然クルクミンの抽出は、洗浄 乾燥 細切 粉碎（ミキサー） 固液抽出 遠心分離 濃縮 精製を実施した。液体クロマトグラフィーを用いて抽出・精製したクルクミンの純度を確認した（純度：86～99%）。

合成クルクミンの合成経路を図1に示す。

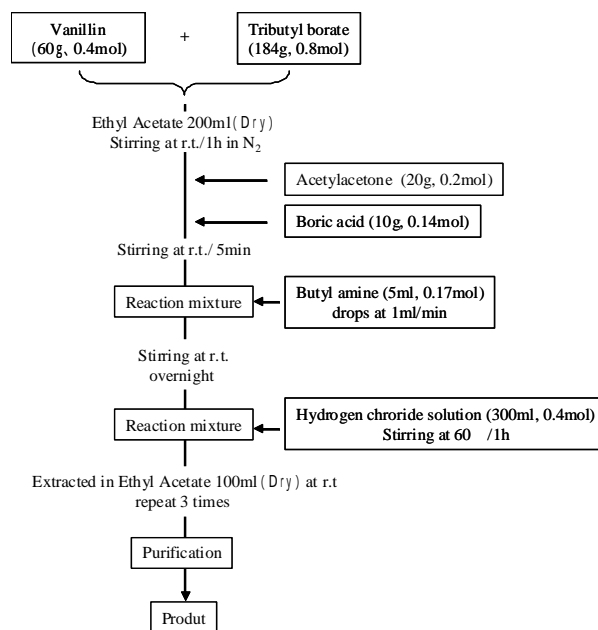


図1. 合成クルクミンの合成経路

安定同位体比分析には、粉碎・乾燥済みの試料を秤量し、洗浄したスズカプセルに包み、元素分析計で燃焼・分離して得た二酸化炭素ガス・窒素ガスをオンライン接続された安定同位体比質量分析計に導入し、炭素・窒素同位体比を測定した。水素・酸素安定同位体比の測定では、粉碎・乾燥済みの試料を銀カプセルに包み、熱分解元素分析計で分解・分離して得た水素・一酸化炭素ガスを分析ターゲットとして測定した。各元素の安定同位体比値は、国際標準物質の同位体存在比(IR)からの隔たりを千分率(‰)で示した値で表した。国際標準物質として、炭素では、Vienna PeeDee

Belemnite (VPDB)、窒素では、大気 (Air) 水素・酸素は Standard Mean Ocean Water (SMOW) を用いた。値は次式で定義される。

$(\text{‰}) = [(IR_{\text{sample}} - IR_{\text{standard}}) / IR_{\text{standard}}] \times 1,000$   
 ここで、IR: 窒素= $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ ; 炭素= $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ ; 水素= $\text{D} / \text{H}$ ; 酸素= $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$

#### 4. 研究成果

##### (1) ウコンの安定同位体比

研究期間中に収集したウコンの安定同位体比は、国産品 (n=26) は  $^2\text{H} = -57 \pm 11.6\text{‰}$  (平均値  $\pm$  標準偏差)、 $^{13}\text{C} = -27.5 \pm 0.90\text{‰}$ 、 $^{15}\text{N} = 6.6 \pm 2.29\text{‰}$ 、 $^{18}\text{O} = 20.1 \pm 1.31\text{‰}$ 、外国産 (n=12) は  $^2\text{H} = -63 \pm 21.0\text{‰}$ 、 $^{13}\text{C} = -27.7 \pm 0.87\text{‰}$ 、 $^{15}\text{N} = 2.9 \pm 2.13\text{‰}$ 、 $^{18}\text{O} = 18.8 \pm 1.40\text{‰}$  であった。窒素・酸素・水素同位体においては国産品が外国産品に比べ高い傾向を示した。

一般的に、植物の窒素安定同位体比は、土壌の窒素分の由来により異なる。また、作物の窒素安定同位体比は施肥の方法に大きく依存し、作物自身の代謝による同位体分別と土壌中有機物の分解速度の影響を受ける。窒素同位体比において、国産ウコンに比べ外国産ウコンの値が低い傾向を示したが、これは土壌中における微生物の活動による同位体分別効果及び(化学/有機)肥料の投入の影響によると考えられる。

また、窒素及び酸素同位体比の結果を組み合わせるにより、国産と外国産ウコンの産地識別の可能性を示す差異が見られた(図2)。

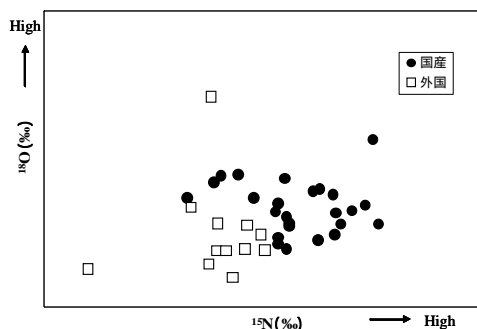


図2 国産と外国産ウコンの窒素・酸素同位体

採取地点(沖縄、京都、群馬)の栽培環境(土壌・灌漑用水)の同位体組成を表1に示す。炭素同位体による地域差は見られなかったが、灌漑用水の水素・酸素同位体

において、沖縄 > 京都 > 群馬と緯度が高くなるにつれ値が低くなる傾向を示した。杉本は水分の蒸発、降雨に伴う  $^2\text{H}$ 、 $^{18}\text{O}$  濃縮による緯度効果を地域用水の特徴付ける大きな要因の一つとして報告している<sup>4</sup>。一般的に植物の組織を構成する水素・酸素は、生成過程で、植物体内の水分子中の水素・酸素が利用され、その安定同位体比は、生育環境での水の同位体比を引き継ぐことになると考えられるが、本研究では、ウコンの水素・酸素同位体比において明確な緯度効果が確認されなかった。この点について明確な原因特定には至らなかったが、地下で成長する球根類植物の生態を考慮すると、生育環境水の影響というよりも、地下での生長途中において同位体分別が起こる可能性を示唆している。また、ウコン栽培期間中に採取した植物部位ごとの窒素同位体結果においても、栽培地域・採取期間に関わらず、葉 > 茎 > 土壌 > ウコンという傾向が見られた。

表1 (沖縄、京都、群馬)の土壌・灌漑用水の同位体組成

採取地点	採取年度	土壌		灌漑用水	
		$^{13}\text{C}$ (‰)	$^{15}\text{N}$ (‰)	$^2\text{H}$ (‰)	$^{18}\text{O}$ (‰)
沖縄	2014年	-26.3	3.3	-37	-7.8
	2015年	-25.1	3.3	-29	-6.3
京都	2014年	-27.5	5.9	-59	-10.3
	2015年	-27.8	6.4	-67	-10.2
群馬	2014年	-26.3	5.7	-75	-11.5
	2015年	-28.1	3.1	-71	-10.7

##### (2) クルクミンの安定同位体比及び製造由来の識別

ウコンより抽出されたクルクミン天然品 (n=12) の同位体は、 $^2\text{H} = -90 \pm 7.2\text{‰}$  (平均値  $\pm$  標準偏差)、 $^{13}\text{C} = -30.0 \pm 0.97\text{‰}$ 、 $^{18}\text{O} = 9.2 \pm 1.87\text{‰}$ 、化学合成品 (n=8) の同位体は、 $^2\text{H} = -42 \pm 15.8\text{‰}$ 、 $^{13}\text{C} = -28.8 \pm 3.16\text{‰}$ 、 $^{18}\text{O} = 6.5 \pm 3.90\text{‰}$  であった。クルクミンの同位体組成は、水素・炭素・酸素ともにウコンより低い傾向が見られた。一般的に、ウコンは植物の根茎で、その成長基質は植物の葉で光合成した炭水化物が根に転流したものをエネルギー源としており、根茎発達に伴うクルクミン類を蓄積している。天然品の同位体は植物成長に伴い同位体分別を起こし、クルクミンの同位体組成に至ると考えられる。

一方、化学合成品の同位体組成は、天然品より  $^{13}\text{C}$  が多く、 $^{18}\text{O}$  が少ない傾向が見られた。また、天然品と合成品の水素同位体には有意な変動が確認され、識別指標として応用される可能性が示唆された(図3)。

パニリンを出発原料とするクルクミン合

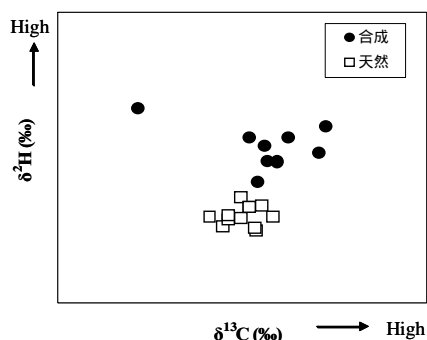


図3 天然/合成クルクミンの炭素・水素同位体

成反応では、生成物クルクミン 1 分子あたり 2 個のバニリン分子と 1 個のアセチルアセトン分子が由来したものである。本研究で用いたバニリンの炭素・酸素組成は、 $^{13}\text{C} = -28.4 \pm 2.73\text{‰}$ 、 $^{18}\text{O} = 8.2 \pm 5.57\text{‰}$ （製造元：中国、アメリカ、日本 2 種）であった。クルクミンの炭素・酸素原子が出発原料の元素組成に引継ぎ、炭素・酸素原子の置換は起こらないことを反映した。

同位体結果を識別指標として利用するためには、指標元素の安定性を検討する必要がある。炭素原子が有機物の骨格を形成する安定な構造に対して、水素はしばしば反応性に富む官能基を構成するため、出発原料の元素組成の引継ぎだけでなく、製造・精製プロセスにおけるプロトンの交換によって容易に入れ替わると考えられる。そこで、透析チューブを用いてクルクミンを水で 5 週間透析し、週ごとのクルクミン分子の水素同位体結果の経時変化を確認した。その結果、水素同位体のバラつきが 2.3‰ 以下であり、製造由来の識別指標として応用できると考えられる。なお、市販の A 社製ウコン由来と称する栄養ドリンクと栄養剤（顆粒状）を用いて、固液・液液抽出にてクルクミンを抽出し、その後同位体分析を行った。炭素・水素同位体比を比較した結果、天然品と有意の差が見られなかった。

以上のことから、ウコンの同位体比において、窒素・酸素同位体比を用いて国産と外国産ウコンの産地識別の可能性が示唆された。また、ウコンより抽出されたクルクミン天然品及び化学合成品の同位体分析結果により、水素安定同位体が製造由来の指標元素として有効であった。製造由来を精度良く識別するため、指標元素のさらなる検討が期待される。

## 「引用文献」

H.J.J. Pabon, A synthesis of curcumin and related compounds, *Rec. Trav. Chim. Pays. Bas.* 83(4), 1964, 379-386

鈴木弥彌子、中下留美子、赤松史一、伊永隆史、安定同位体比分析による国産米及び有機栽培の可能性、*BUNSEKI KAGAKU*, 58(12), 2009, 1053-1058

力石嘉人、大場康弘、ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計による分子レベル安定同位体比分析法、*Res.Org.Geochem.* 23(24), 2008, 99-122

杉本敦子、水の安定同位体から水の動きを追う、*細氷*, 51, 2005

## 5 . 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

### 「学会発表」

飯田始、山口耕生、篠原宏文、王曉水  
Method development for isotope analysis of oxygen in phosphate as a new tool for identifying biosignature in the early Earth and beyond, Project A in Amami-ooshima、鹿児島、2016年3月4日～8日

H. Iida, K.E. Yamaguchi, and X. Wang  
Concise method for isotope analysis of oxygen in phosphate: A new inorganic biomarker, *Goldschmidt2016-Goldschmidt Conference Archive*, Yokohama, 26 June - 1 July, 2016

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

王曉水 (Xiaoshui Wang)

公益財団法人日本分析センター・その他部局等・研究員(移行) 研究者番号: 10544273

### (2) 研究分担者

篠原宏文 (Hirofumi Shinohara)

公益財団法人日本分析センター・その他部局等・研究員(移行) 研究者番号: 10556236

大槻孝之 (Takayuki Otsuki)

公益財団法人日本分析センター・その他部局等・研究員(移行) 研究者番号: 80649814

磯貝啓介 (Keisuke Isogai)

公益財団法人日本分析センター・その他部局等・研究員(移行) 研究者番号 30544176