

(理論値： m/z 933.2659, $C_{43}H_{49}O_{23}$) となり，MS/MS では， m/z 771, 433, 271 が検出され，pelargonidin 3-feruloylsphoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 14). ピーク 10 は， $[M+H]^+$ m/z 1097.275 (理論値： m/z 1097.2769, $C_{51}H_{53}O_{27}$) となり，MS/MS では， m/z 935, 499, 287 が検出され，cyanidin 3-(6'',6'''-dicaffeoylsphoroside)-5-glucoside と同定できた (Fig. 15). ピーク 11 は， $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値： m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり，MS/MS では， m/z 787, 463, 301 が検出され，peonidin 3-caffeoylsphoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 16). ピーク 12 は， $[M+H]^+$ m/z 1111.290 (理論値： m/z 1111.2925, $C_{52}H_{55}O_{27}$) となり，MS/MS では， m/z 949, 463, 301 が検出され，peonidin 3-dicaffeoylsphoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 17). ピーク 13 は， $[M+H]^+$ m/z 1125.306 (理論値： m/z 1125.3082, $C_{53}H_{57}O_{27}$) となり，MS/MS では， m/z 963, 463, 301 が検出され，peonidin 3-caffeoyl-feruloylsphoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 18). ピーク 14 は， $[M+H]^+$ m/z 1095.297 (理論値： m/z 1095.2976, $C_{52}H_{55}O_{26}$) となり，MS/MS では， m/z 933, 583, 433 が検出され，pelargonidin 3-caffeoyl-p-coumaroylsphoroside-5-glucoside と同定できた (Fig. 19).

一方で，ムラサキヤマモの LC-MS クロマトグラムを Fig. 20 に示す. 検出波長 523～545 nm による主な検出は，8 ピーク観察され，いずれも ESI-Positive モード (m/z 200～2000) でマススペクトルを得ることができた. しかしながら，ムラサキイモのような報告例がなく，同定することはできなかった. しかしながら，いずれの MS スペクトルは良好に取得することができ，今後，本ピークを同定することが必要と思われる (Fig. 21, 22). Table 1 には，各種検出されたイオンおよび推定される分子式を示す.

D. 考察

本研究では，8 版公定法および 4 版自主規格を基盤に国内で入手可能なムラサキイモ色素，

ムラサキイモ，ムラサキヤマモの規格基準評価を実施した. その結果，いずれも規格基準内と判断できた. しかしながら，ムラサキイモおよびムラサキヤマモの区別は不可能であった. そこで，HPLC によるクロマトグラムパターンを比較した結果，最大吸収波長（ムラサキイモ：515～535 nm，ムラサキヤマモ：525～545 nm）によるピークが全く異なっていた. つまり，各規格基準に準じるが，その由来成分は全く異なることが分かった. そのため，各ピークの成分を同定し，新たな規格基準指標をタンクする必要がある. そのため，LC-MS によって，各ピークの同定を実施することとした. Table 2 にムラサキイモ色素の吸収極大波長および同定された物質名をまとめた. いずれも報告されている既知の物質であり，いずれも有効な指標物質になりえると考えられる. 一方で，ムラサキヤマモに関しては，いずれも良好な MS スペクトルを取得することができたが，各ピークから物質を同定することができなかった. 今後の比較検討で各成分の同定は重要な情報となるため，早急に NMR などを利用して，確認する必要がある.

E. 結論

国内流通のムラサキイモ色素，ムラサキイモ，ムラサキヤマモの判断について，以下に示す.

・現状の規格基準

8 版公定法および 4 版自主規格の確認試験において，すべての成分において，規格基準内であった.

・ムラサキイモとムラサキヤマモの識別

8 版公定法および 4 版自主規格の確認試験では，識別は不可能であった. 一方で，HPLC 法による規格基準の波長領域において，各ピークパターンが全く異なり，識別は可能であった.

・各成分の同定

HPLC 法に準じ，検出されたピークの同定を試みた. その結果，ムラサキヤマモについて

は、すべて同定することができた。一方で、ムラサキヤマイモについては、全く同定することができなかった。

・今後の検討

ムラサキヤマイモの成分を同定し、両色素の識別に有用な成分を探索することが必要である。また、加水分解法なども利用して、アグリコンによる簡便な分離分析なども検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願，登録状況

特になし

I. 参考文献

1) 8th Edition of JAPAN'S SPECIFICATIONS AND STANDARDS FOR FOOD ADDITIVES D479-D482.

2) 日本食品添加物協会；第4版 既存添加物自主規格 平成20年10月13日発行
吉積智司，奥山秀俊，遠山良介；食品工業 23, 41-67 (1980).

3) Lee, M.J., Park, J.S., Choi, D.S., Jung, M.Y.; J. Agric. Food Chem. 61, 3148-3158 (2013).

4) Truong, V.D., Deighton, N., Thompson, R.T., McFeeters, R.F., Dean, L.O., Pecota, K.V., Yencho, G.C.; J. Agric. Food Chem. 58, 404-410 (2010).

5) 小竹 欣之輔, 畑中 颯和, 梶原 忠彦, 室井 てる予, 西山 浩司, 山川 理, 寺原 典彦, 山口 雅篤；日本食品工業学会誌 41, 281-286 (1994).

6) 寺原 典彦, 沖 智之, 松井 利郎, 福井 敬一, 杉田 浩一, 松本 清, 須田 郁夫；日本食品科学工学会

誌 54, 33-38 (2007).

7) 李 佩璇, 志和地 弘信, 入江 憲治, Ye Tint Tun, 石田 裕, 豊原 秀和；熱帯農業研究 3, 62-69 (2010).

8) 津久井 亜紀夫, 桑野 和民, 三田村 敏男, 谷村 和八郎；日本農芸化学会誌 51, 471-476 (1977).

5) 西沢信, 長南隆夫, 赤城幾代, 杉井孝雄；道衛研所報 33, 28-34 (1983).

6) 萩原勉, 天川映子, 平田恵子, 野沢竹志, 大西和夫, 坂井千三；東京衛研年報 36, 245-250 (1985).

7) 長南隆夫, 堀義宏, 西沢信, 杉井孝雄；道衛研所報 35, 34-39 (1985).

8) 山田貞二, 大島晴美, 斎藤勲, 早川順子；食衛誌 37, 372-377 (1996) .

9) Lech, K., Witowska-Jarosz, J., Jarosz, M; J. Mass Spectrom. 44, 1661-1667 (2009)

10) Cao, H., Feng, Q., Xu, W., Li, X., Kang, Z., Ren, Y., Du, L; Biol. Pharm. Bull. 33, 1343-1348(2010).

11) Nam, K.N., Choi, Y.S., Jung, H.J., Park, G.H., Park, J.M., Moon, S.K., Cho, K.H., Kang, C., Kang, I., Oh, M.S., Lee, E.H.; Int. Immunopharmacol. 10, 493-499 (2010).

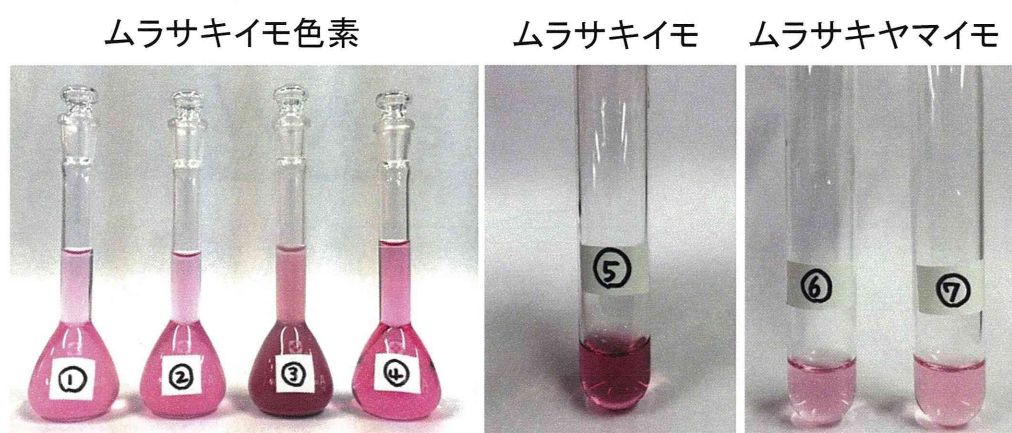


Fig. 1 8 版公定法および 4 版自主規格の確認試験(1)

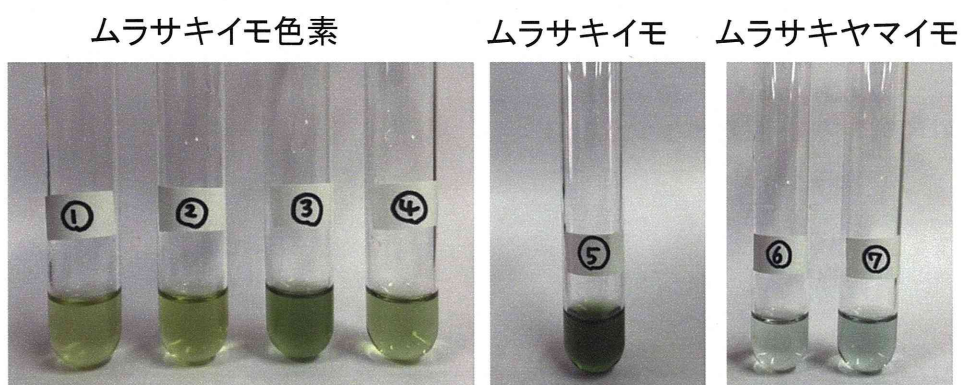
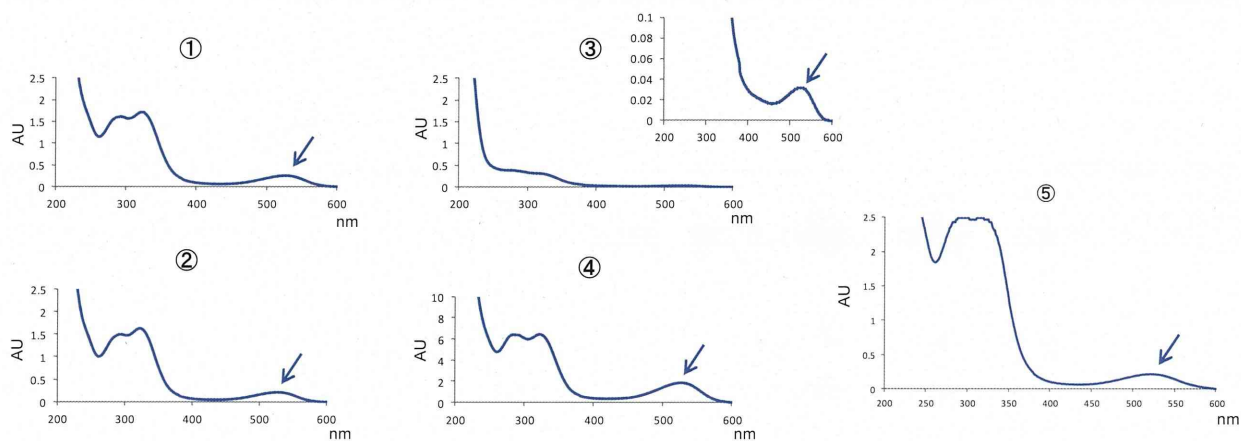


Fig. 2 8 版公定法および 4 版自主規格の確認試験(2)

ムラサキイモ色素(515～535 nm)



ムラサキヤマイモ色素(525～545 nm)

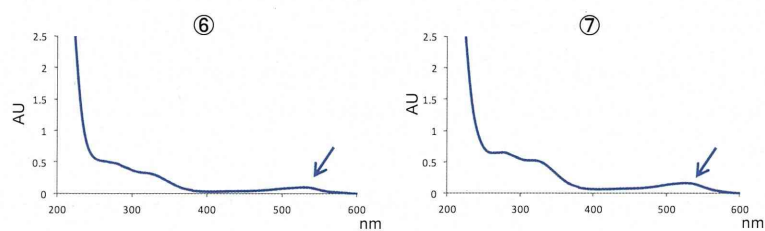


Fig. 3 8版公定法および4版自主規格の確認試験(3)

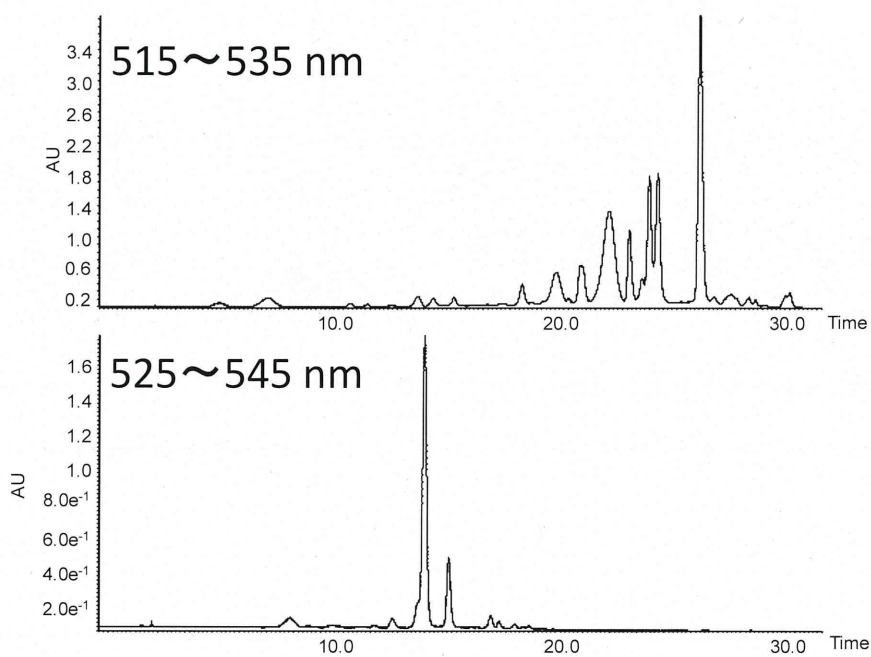


Fig. 4 HPLC クロマトグラム
(上段：ムラサキイモ，下段：ムラサキヤマイモ)

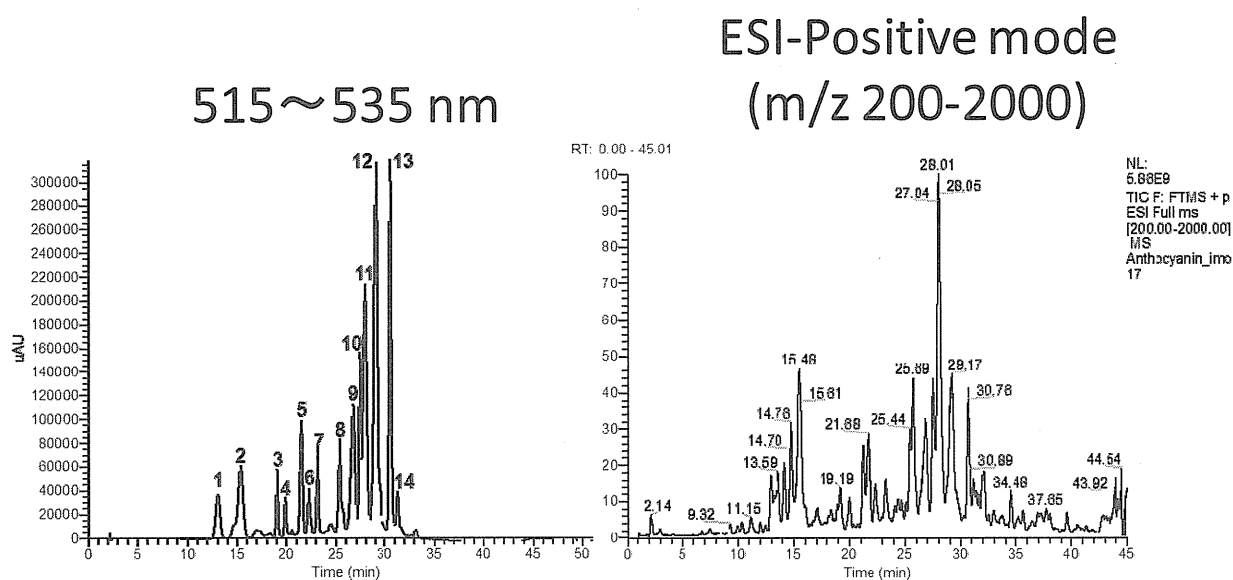


Fig. 5 ムラサキイモの LC-MS クロマトグラム

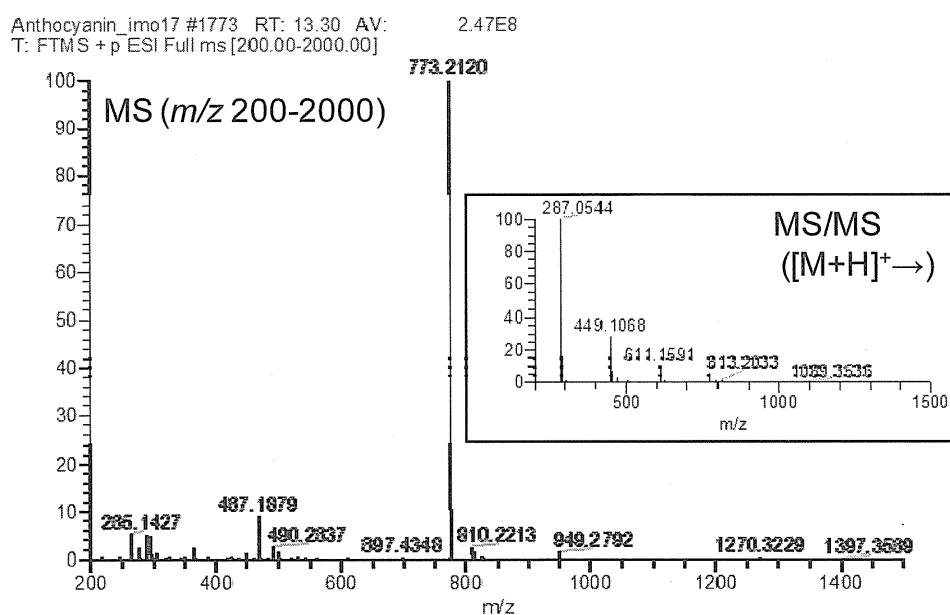


Fig. 6 ムラサキイモ (ピーク 1) の MS スペクトル

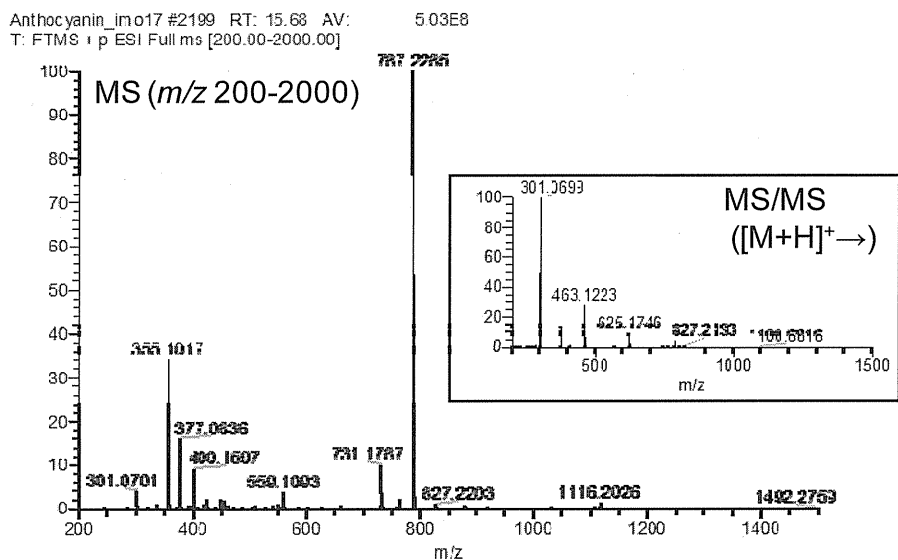


Fig. 7 ムラサキイモ (ピーク 2) の MS スペクトル

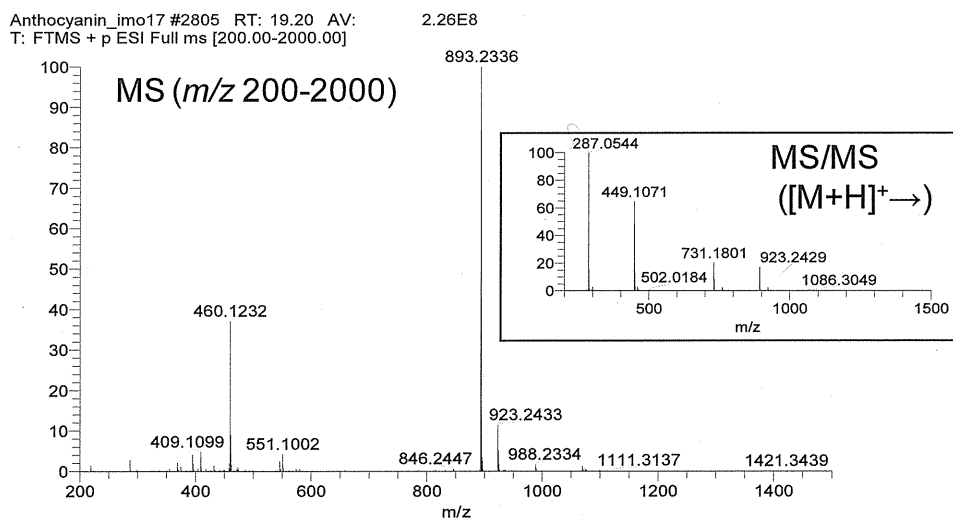


Fig. 8 ムラサキイモ (ピーク 3) の MS スペクトル

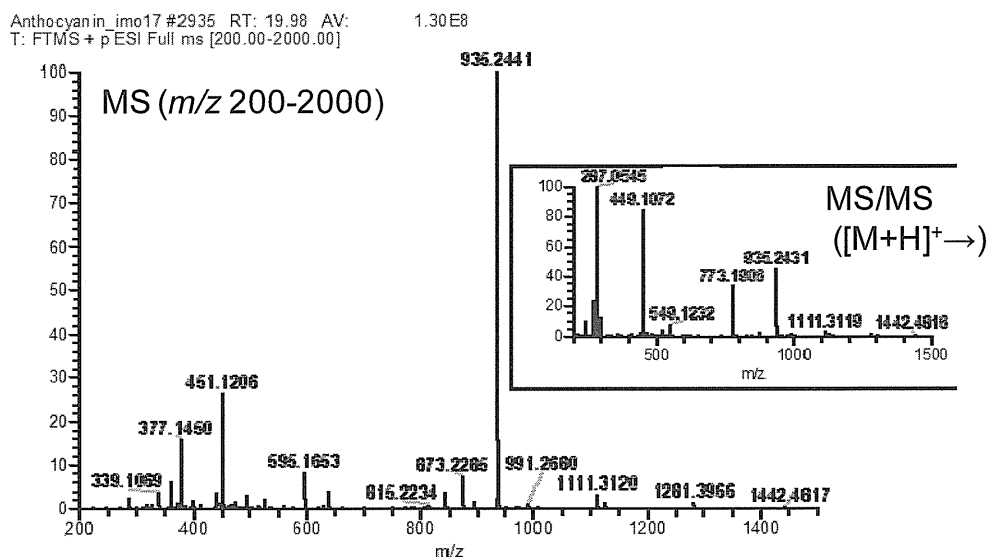


Fig. 9 ムラサキイモ (ピーク 4) の MS スペクトル

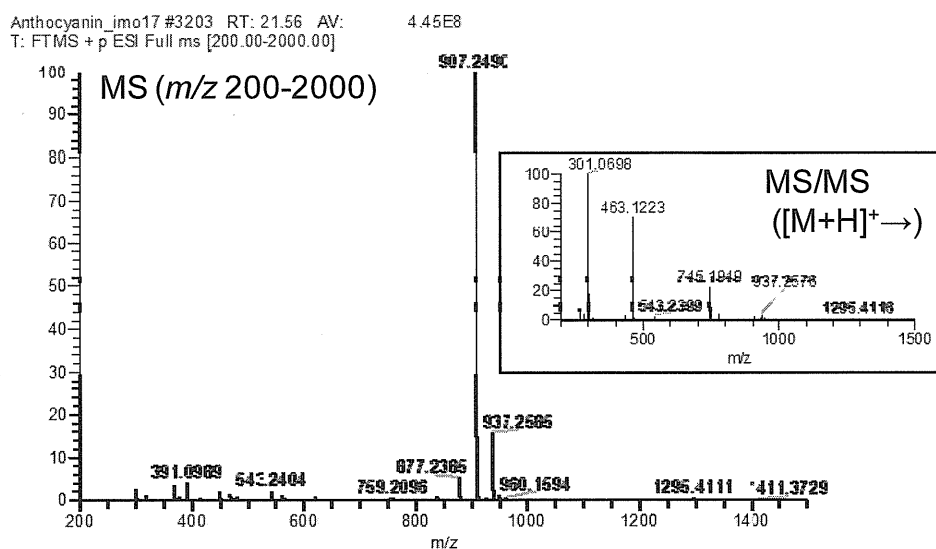


Fig. 10 ムラサキイモ (ピーク 5) の MS スペクトル

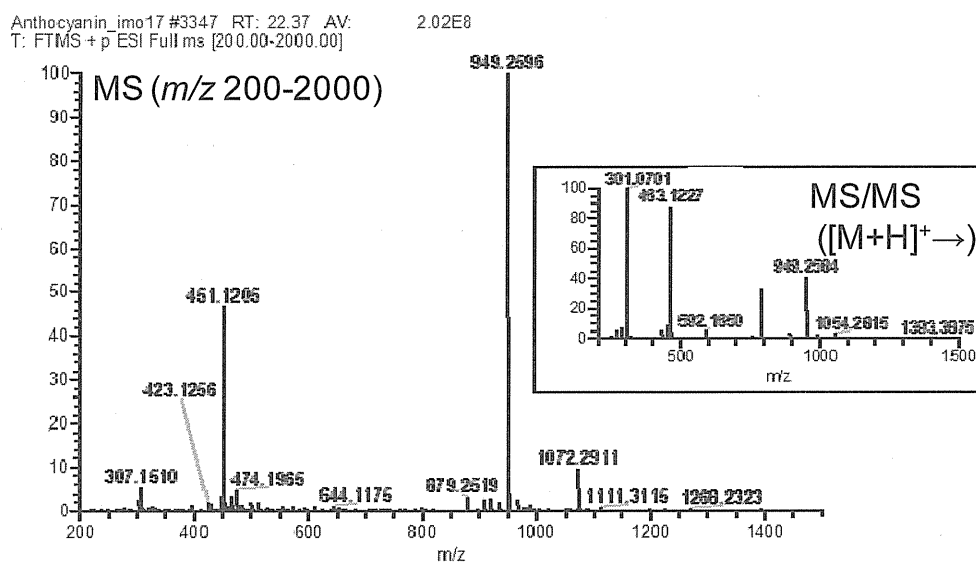


Fig. 11 ムラサキイモ (ピーク 6) の MS スペクトル

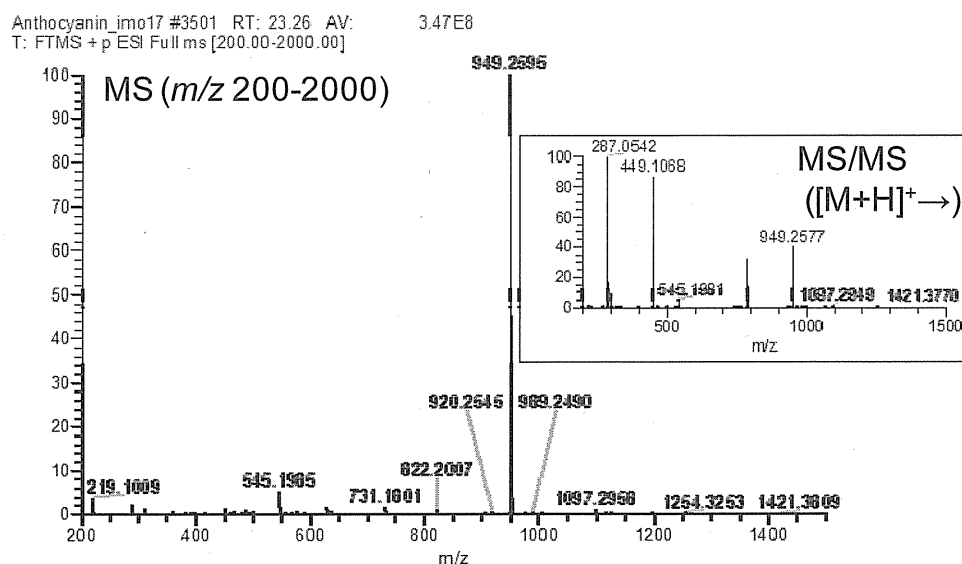


Fig. 12 ムラサキイモ (ピーク 7) の MS スペクトル

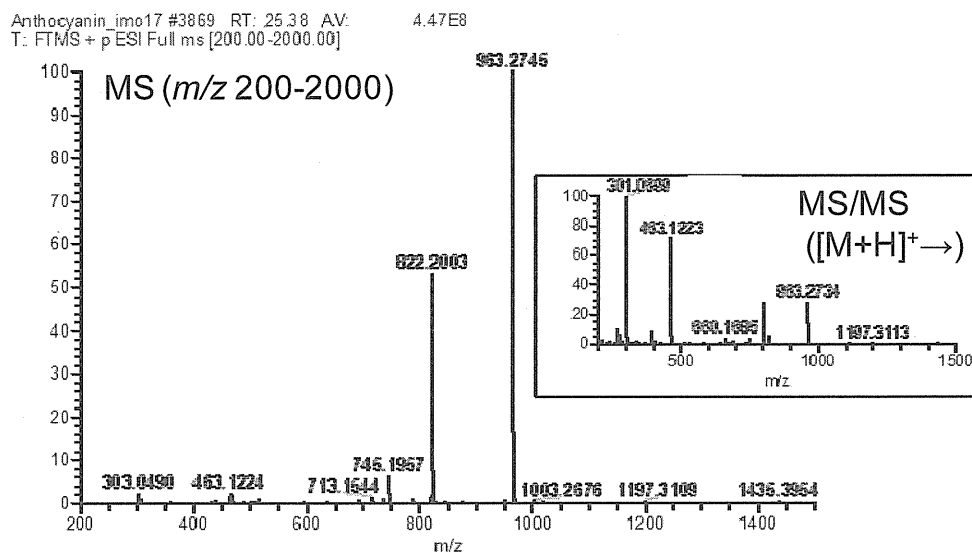


Fig. 13 ムラサキイモ (ピーク 8) の MS スペクトル

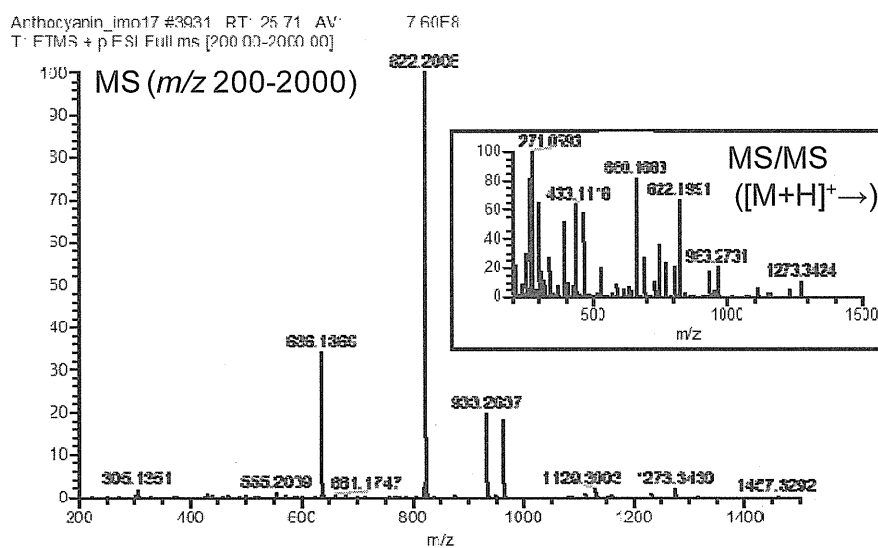


Fig. 14 ムラサキイモ (ピーク 9) の MS スペクトル

Anthocyanin_imo17 #4255 RT: 27.51 AV: 2.16E8
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

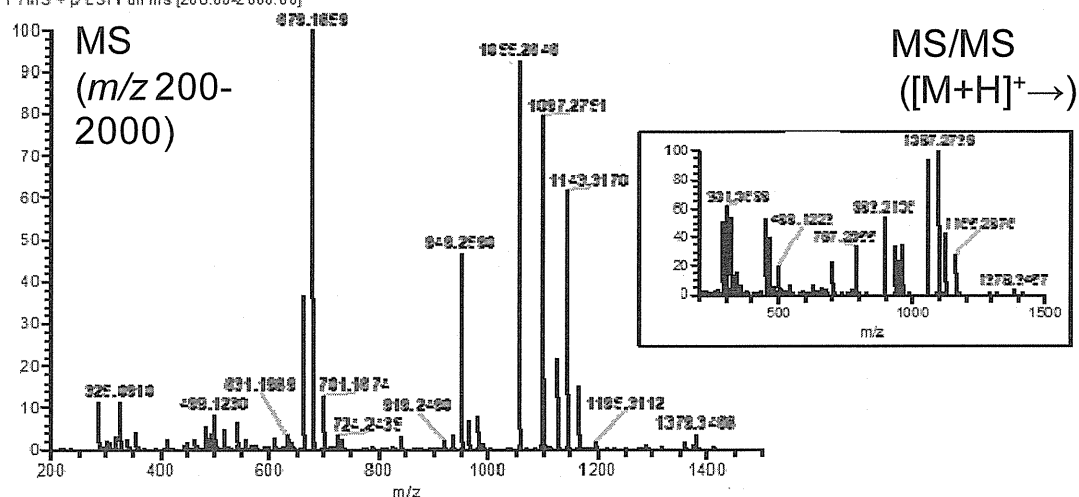


Fig. 15 ムラサキイモ (ピーク 10) の MS スペクトル

Anthocyanin_imo17 #4379 RT: 28.18 AV: 9.16E8
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

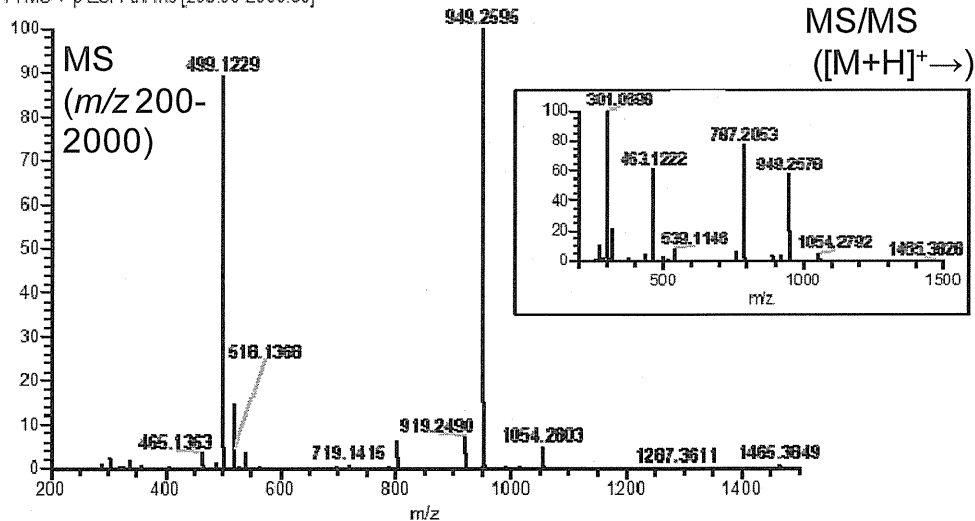


Fig. 16 ムラサキイモ (ピーク 11) の MS スペクトル

Anthocyanin_imo17 #4549 RT: 29.12 AV: 6.80E8
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00 2000.00]

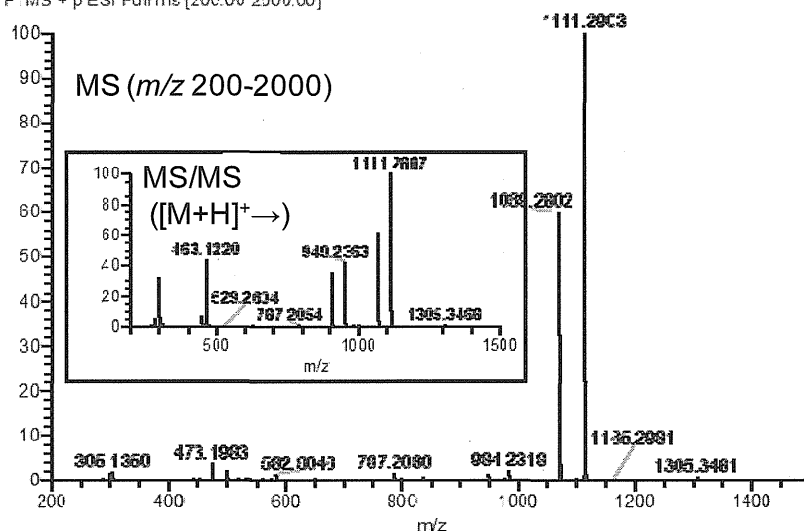


Fig. 17 ムラサキイモ (ピーク 12) の MS スペクトル

Anthocyanin_imo17 #4817 RT: 30.64 AV: 1.02E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

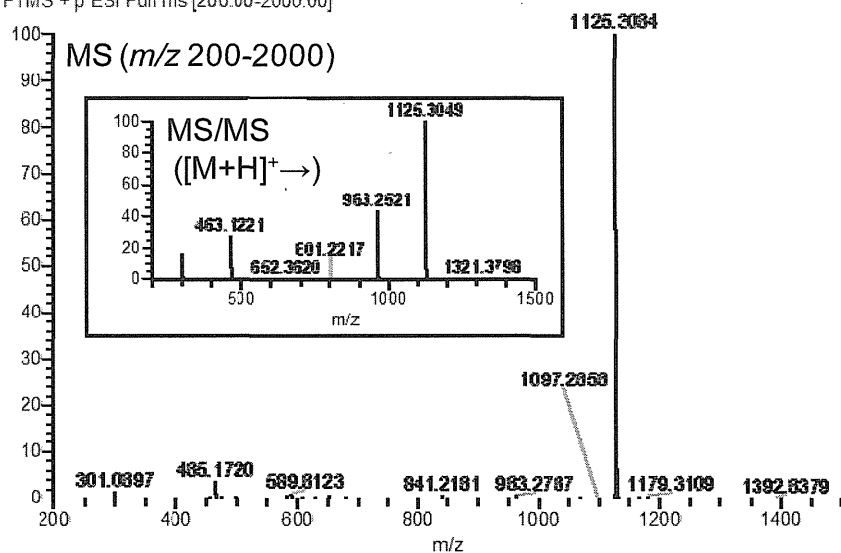


Fig. 18 ムラサキイモ (ピーク 13) の MS スペクトル

Anthocyanin_imo17 #4947 RT: 31.35 AV: 1.48E8
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

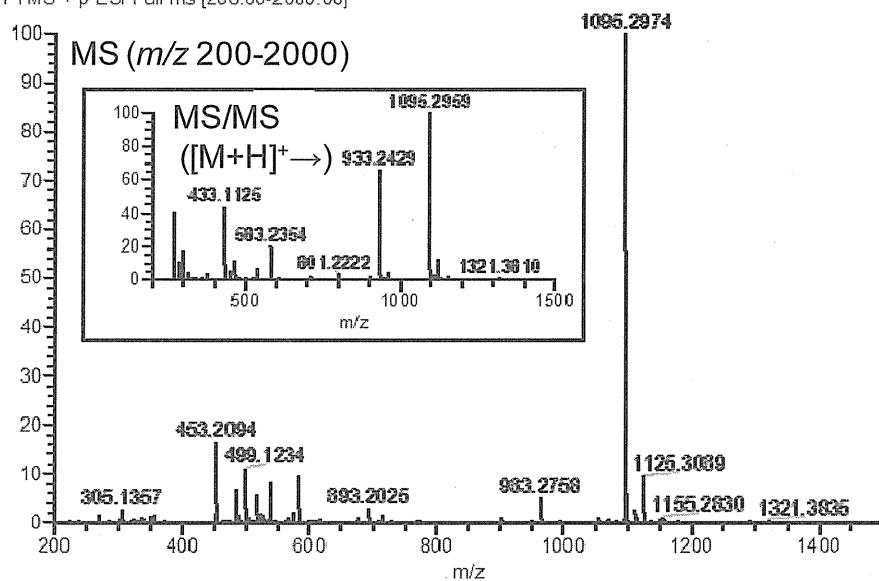


Fig. 19 ムラサキイモ (ピーク 14) の MS スペクトル

ESI-Positive mode
525 ~ 545 nm
(m/z 200-2000)

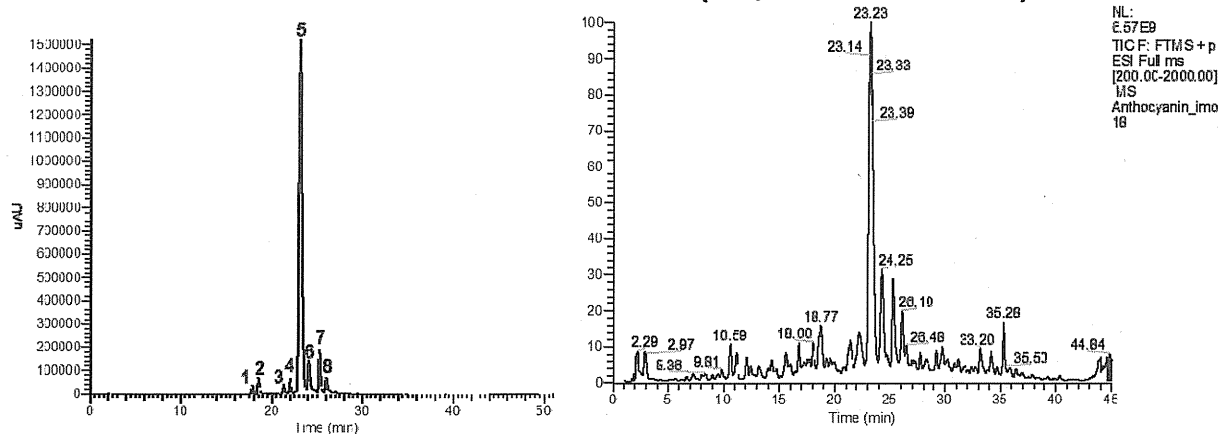


Fig. 20 ムラサキヤマイモの LC-MS クロマトグラム

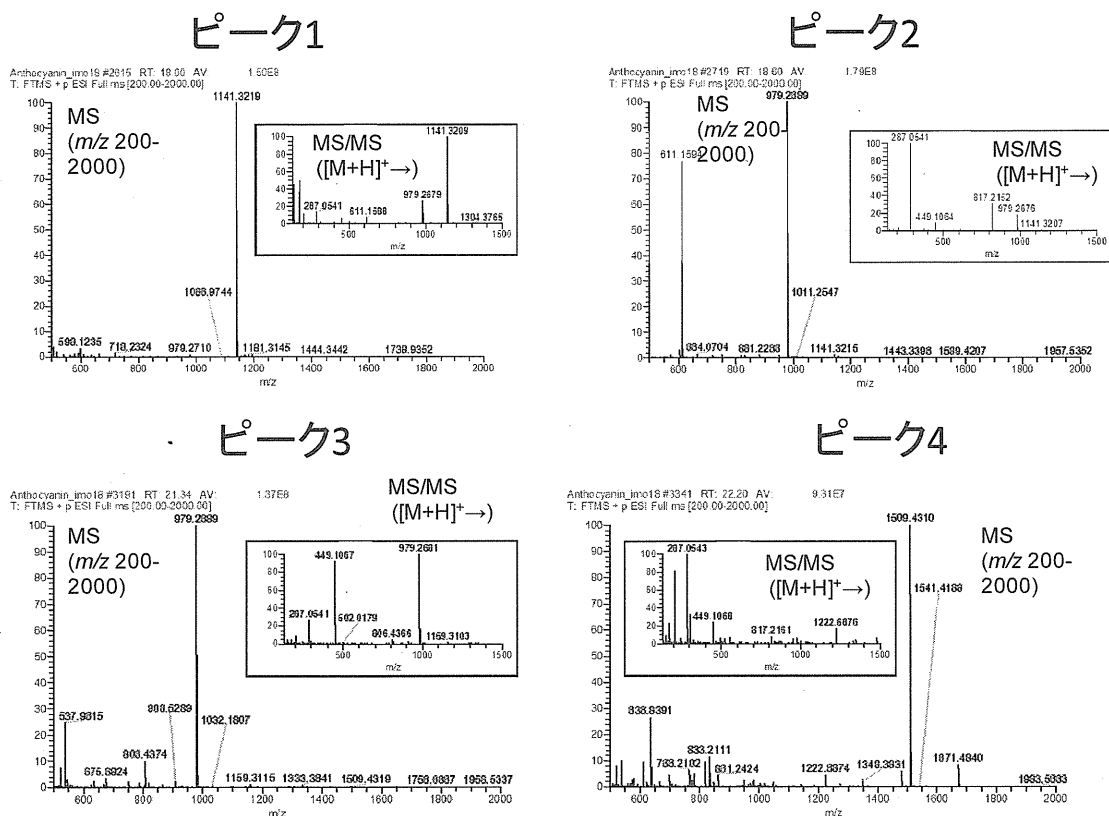


Fig. 21 ムラサキヤマイモ (ピーク 1~4) の MS スペクトル

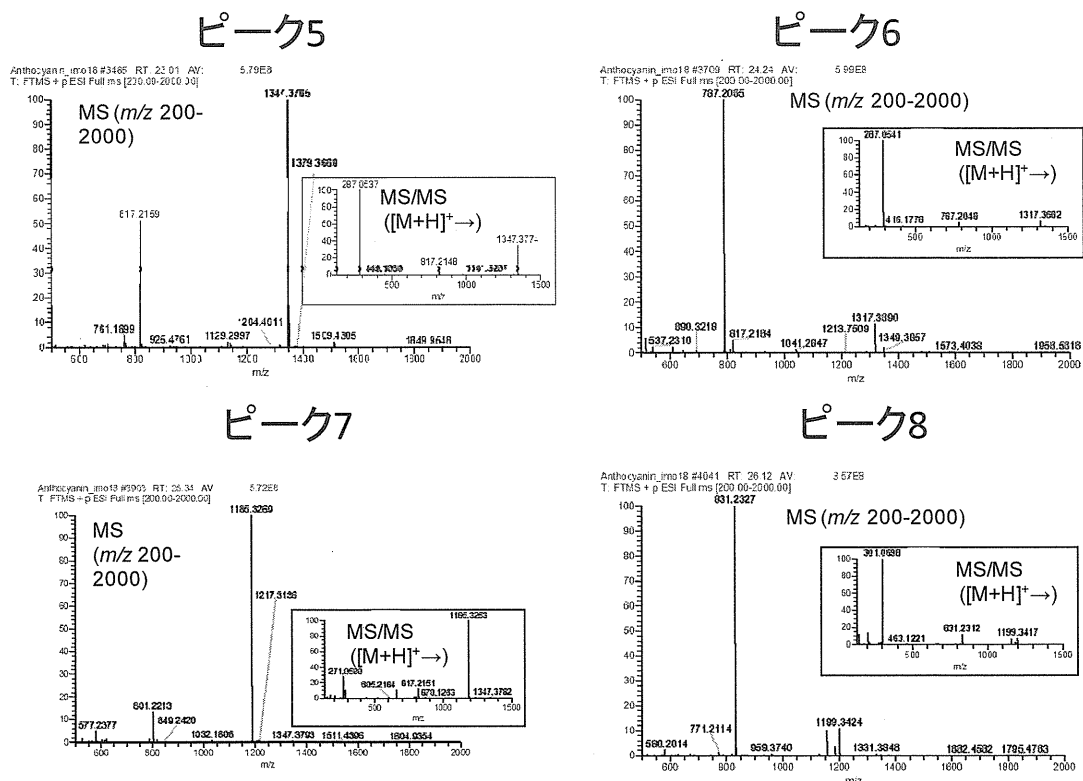


Fig. 22 ムラサキヤマイモ (ピーク 5~8) の MS スペクトル

Table 1 ムラサキヤマイモの色素成分に関する吸収極大および MS 情報

Peak	RT (min)	$\lambda_{\max}$	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	Molecular formula
1	17.86	515, 330, 285	1141.322	979, 611, 287	C ₅₀ H ₆₁ O ₃₀
2	18.46	525, 330, 285	979.269	817, 449, 287	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₅
3	21.29	525, 330, 285	979.269	449, 287	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₅
4	22.04	530, 330, 295	1509.431	1222, 817, 449, 287	C ₆₇ H ₈₁ O ₃₉
5	23.10	530, 330, 285	1347.379	817, 449, 287	C ₆₁ H ₇₁ O ₃₄
6	24.09	530, 330, 285	787.207	416, 287	C ₃₇ H ₃₉ O ₁₉
7	25.30	535, 330, 290	1185.327	817, 655, 217	C ₅₅ H ₆₁ O ₂₉
8	26.00	530, 330, 385	831.233	301	C ₃₉ H ₄₃ O ₂₀

Table 2 ムラサキイモの色素成分に関する吸収極大および同定物質

Peak	RT (min)	$\lambda_{\max}$	Identification
1	13.05	515, 280	cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside
2	15.35	515, 325	penidin 3-sophoroside-5-glucoside
3	19.02	520, 320, 285	cyanidin 3- <i>p</i> -hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside
4	19.87	520, 325, 285	cyanidin 3-(6''-caffeoylsophoroside)-5-glucoside
5	21.48	515, 325, 280	peonidin 3- <i>p</i> -hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside
6	22.23	515, 330, 275	peonidin 3-(6'''-caffeoylsophoroside)-5-glucoside
7	23.12	525, 330, 280	cyanidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside
8	25.34	520, 330	peonidin 3-ferulyolsophoroside-5-glucoside
9	26.68	525, 325, 285	pelargonidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside
10	27.36	530, 325, 295	cyanidin 3-(6',6'''-dicafeoylsophoroside)-5-glucoside
11	27.9	525, 330, 300	peonidin 3-caffeoylsophoroside-5-glucoside
12	29.04	530, 330, 280	peonidin 3-dicafeoylsophoroside-5-glucoside
13	30.55	530, 330, 295	peonidin 3-caffeoyl-feruloylsophoroside-5-glucoside
14	31.31	525, 325, 295	pelargonidin 3-caffeoyl- <i>p</i> -coumaroylsophoroside-5-glucoside

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物クチナシ黄色素の成分規格の検討

分担研究者 井之上 浩一 静岡県立大学薬学部 講師

研究要旨

既存添加物名簿および日本食品添加物協会「既存添加物自主規格」に記載されている「クチナシ黄色素」および「サフラン色素」の成分規格を行うため、それぞれの比較検討を実施した。初めに、8版公定法を基盤に国内で流通するクチナシ黄色素2製品およびサフラン色素1製品の評価を行った。その結果、本評価では、サフラン色素とクチナシ黄色素を区別することが不可能であった。そこで、HPLCによる色素成分クロシン、クロセチンおよび不純物であるゲニポシドの一斉分析法を開発し、アルカリ加水分解前後の評価を行った。アルカリ分解後の製品を測定した結果、ほぼ同様のクロマトグラムを得ることができ、*trans*型クロセチンが最も有効に検出することができ、本化合物を指標とすることができた。その結果、アルカリ分解後のクロセチン含有量は、クチナシ黄色素では67.6%および45.5%であり、サフラン色素では42.3%となった。しかしながら、お互いの色素を明確に識別することは不可能であった。一方、ゲニポシドにおいては、クチナシ黄色素から僅かであるが検出することができた。その一方で、アルカリ加水分解すると、ゲニポシドのピークは減少し、新たにゲニピンのピークが検出された。しかし、現在の8版公定法では、その点について、判断することはできない。今後、ゲニピンを含めた不純物質試験が要求されるものと思われる。

A. 研究目的

クチナシ黄色素は、アカネ科クチナシ（*Garden augusta* Merrill もしくは、*Gardenia jasminoides* Ellis）の果実を水または、エタノールで抽出、若しくは加水分解を経て得られる色素であり、クロシンおよびクロセチンを主成分とする（Fig. 1）。また、一般的には、クチナシ黄色素は非色素成分としてゲニポシドも含まれている（Fig. 1）。本着色料製剤は、黄～暗赤色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なおいがある。現在、第8版食品添加物公定書（以下、8版公定法）では、クチナシ黄色素の確認試験、ゲニポシド純度試験、色価測定法が規定されている¹⁾。特に、確認試験や色価測定法では、アルカリ条件下により、クロシ

ンを加水分解し、その殆どをクロセチンにしたものを分析対象としている。これは、クロセチン高含量（殆どクロシンを含有しない）製品が国内に流通していることから、本試験はクロシンおよびクロセチンのいずれかを主成分とする製品に対応するための規格としている。また、純度試験には、ゲニポシドを0.5%以下（色価100に換算）として、HPLCによる定量法が規格されている。クチナシ黄色素により着色された食品が青変する現象が報告されており、その原因にゲニポシドと食品中アミノ酸の反応により、青色物質変性を生じる²⁾。そのために、近年では、ゲニポシドを全く含まない製剤も市販されるようになってきた。それに加え、ゲニポシドおよびその分解物であるゲニピンの薬理活性評価に基づき、純度規定がなされている。

さらに、サフラン色素 (Saffron Color) は、欧米を中心に食品の着色に利用されており、クチナシ黄色素同様にクロシンおよびクロセチンを主成分としている。サフラン色素は、アヤメ科サフラン (*Crocus sativus* Line) の雌蕊頭から、エタノールで抽出され、ゲニポシドは含有していない。サフラン色素は、国内では一般飲食物添加物リストに記載されており、日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」(以下、4版自主規格)に成分規格が示されている³⁾。本確認試験および純度試験では、アルカリ条件下などによる加水分解もなく、黄色の色調およびpHによる変色のみとなっている。

クチナシ黄色素の分析については、色素成分(クロシン)またはゲニポシドを確認試験とする分析法が報告されている⁴⁻⁶⁾。しかしながら、クチナシ黄色素やサフラン色素製剤の成分は類似しており、色素成分およびゲニポシドのみの評価では限界があることが示唆されている⁷⁾。そこで、クチナシ黄色素の確認試験において、アルカリ加水分解により生成するクロセチンを指標として、分離分析する方法が8版公定法に採用されている¹⁾。また、山田らは、加水分解した試料からクロシン、クロセチンおよびゲニポシドを同時分析することで、サフラン色素との識別や確実な定性分析になることを示している⁸⁾。しかしながら、8版公定法に基づいて、妥当性評価や各製品別の判別は現在までに報告されていない。

そこで、本研究では、クチナシ黄色素の確認試験の妥当性評価および8版公定法に準じて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた成分規格分析法の検討を実施した。また、その定量評価を目的として、クロセチンの単離精製を高速向流クロマトグラフィー(HSCCC)により実施し、その指標による製剤分析評価も行った。

B. 研究方法

1. 色素製剤の試料

平成26年度内に国内入手可能なクチナシ黄色素製品(A694:水もしくは、エタノールで抽

出、A12:加水分解を経て得られる色素)およびサフラン色素を試料とした。

2. 試薬及び標準溶液

水酸化ナトリウム、エタノール、硫酸、テトラヒドロフラン、シュウ酸、3-メチル-1-ブタノール、アセトン、ヘキサン、酢酸エチル、酢酸は和光純薬社製(特級)を用いた。ゲニポシドは、和光純薬社製(局方生薬試験)を用いた。精製水およびアセトニトリルは、ミリポア社製を利用した。

0.02 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: 水酸化ナトリウム 7.99 g を量り、精製水 1000 mL で定容した。その後、本溶液を精製水で 10 倍希釈して用いた。

展開溶媒: シュウ酸 5.0 g を精製水により、400 mL に溶解し、シュウ酸溶液(1→80)を調製した。テトラヒドロフラン/アセトニトリル/シュウ酸溶液の容量混合比 8 : 7 : 7 の溶液を調製した。

3. 装置

電子天秤: メトラー製 METTLER AE 100

遠心分離: クボタ製 KUBOTA 2410 および日立製作所社製 HITACHI CF16RX2

恒温振盪水槽: NTS-400A, HU-M, 東京理化学器械(株)製

紫外可視分光光度計: 日立製作所社製 U-2010

HPLC 装置: Waters 社製 Waters Acquity H Class

4. 8版公定法

(1) 対象試料の色価 100 に換算して 0.1g に相当する量を電子天秤で量り、0.02 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 mL を加える。

(2) 対象試料の色価 100 に換算して 0.1g に相当する量を電子天秤で量り、0.02 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 mL を加えて 50℃の水浴中で 20 分間加温し、振り混ぜながら溶かした液を紫外可視分光光度計により測定した。

(3) 対象試料の色価 100 に換算して 0.1g に相当

する量を電子天秤で量り、硫酸 5 mL を加えた。

(4) 対象試料の色価 100 に換算して 1.0 g に相当する量を電子天秤で量り、0.02 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 mL を加えて 50℃ の水浴中で 20 分間加温し、振り混ぜて溶かしものを検液 1 とした。また、比較対象として、精製水 100 mL に溶かしたものを検液 2 とした。展開溶媒 1 を用いて、薄層クロマトグラフィーを行った。担体として薄層クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル (TLC Silica gel 60 RP-18 F254 Merck 社製) を約 100℃ で 1 時間乾燥したものを使用した。展開溶媒の先端が原線より約 10cm 高さに上昇したとき展開をやめ、風乾するとき、黄色のスポットの R_f 値を算出した。いずれも 3 スポット試験した。

(5) ゲニポシド純度試験：対象試料の色価 100 に換算して 1.0 g に相当する量を電子天秤で量り、精製水/アセトニトリル混液 (17:3, V/V) を加えて、正確に 25 mL とし、その上澄み液を検液とする。別にゲニポシド標準品約 0.01g を精密に量り、精製水/アセトニトリル混液 (17:3, V/V) に溶かし、正確に 100 mL とする。更にこの液 1 mL, 5 mL, 10 mL を正確に量り、精製水/アセトニトリル混液 (17:3, V/V) を加えて、それぞれ正確に 100 mL とした液を標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ以下の HPLC 条件にて分析を行った。

ゲニポシドの量(色価 100 に換算)=検液中のゲニポシド濃度(μg/mL)×0.0025(%)

カラム：TSK-GEL ODS-100V column (4.6 × 150 mm, 5.0 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40℃

移動相：水/アセトニトリル (17/3, V/V)

流速：0.5 mL/min

検出波長：238 nm

注入量：10 μL

5. HPLC によるクロシン、クロセチンおよび

ゲニポシドの一斉分析

対象試料及びゲニポシド溶液は水/メタノール混液 (50/50, V/V) により調製した。分析装置は上記のものを使用した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液/メタノールを使用し、5 分間まで 80/20 で送液し、その後、15 分間で 10/90 にグラジュエントした。その後、17 分まで 10/90 とした後、初期条件で安定化を行った。

カラム：Acquity UPLC BEH C18 column (2.1×100 mm, 1.7 μm, Waters 社製)

カラム温度：40℃

移動相：0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸メタノール

流速：0.3 mL/min

検出波長：210-500 nm

注入量：10 μL

6. クロセチンの単離精製

クロセチンの単離精製には、HSCCC を用いた。装置は、クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (マルチ層コイルプラネット型：synchronous type-J planetary motion) を用いた。2 相溶媒系には、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1% ギ酸水溶液 (7/3/5/5, V/V/V/V) を用いた。HSCCC 用試料は、8 版公定法に従い、加水分解したクチナシ黄色素溶液を固相抽出 (Waters 社製 OASIS-HLB, 200 mg/6 mL) により、精製したものを用いた。固相抽出カートリッジの洗浄には、メタノールおよび精製水 5 mL で行い、試料を精製水で 2 倍希釈したものを負荷した。その後、精製水 1 mL で洗浄後、メタノール 1 mL で溶出し、濃縮乾固したもの (8.4 mg) を 2 相溶媒 1 mL にて、再溶解したものを用いた。カラム回転数は、1000 rpm として、2 相溶媒の上層を固定相として、下層を移動相とした。流速は、1.2 mL/min とした。本条件により、得られた分画は、それぞれ HPLC により純度など測定を行った。

7. 質量分析による構造解析

装置には、Waters 社製 LCT Premier XE time-of-flight mass spectrometer (TOF-MS) を用

いた。測定条件は、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI: ポジティブモード), キャピラリー電圧: 3.0 kV, サンプルコーン: 50V, ソース温度: 120°C, ディソルベーション温度: 350°C, コーンガス: 50 L/hr, ディソルベーションガス: 650 L/hr (窒素ガス) とした。スキャンレンジは, m/z 100~1000 に設定した。HPLC 条件は, 上記のものをを用いた。

C. 研究結果

1. 8 版公定法の評価

8 版公定法に従い, 各検液を調製し, (1)~(5) に関する試験を実施した。本試験では, 国内で入手可能なクチナシ黄色素 (三栄源社製 A694 およびリケンビタミン社製 A12) およびサフラン色素を用いた。

(1) いずれも黄色の色彩を示し, 色価などの判別は可能であった (Fig. 2)。

(2) 紫外可視分光光度計により, 吸光度を測定した。本結果を Fig. 3 に示す。8 版公定法に従い, 実施したクチナシ黄色試料は, 420 nm において吸収極大波長が観察された。一方で, サフラン色素では, 430 nm 付近での吸収極大波長を示すが, クチナシ黄色との判別は困難なものと思われる (Fig. 3)。

(3) 対象試料の色価 100 に換算して, 硫酸を加えた (Fig. 4)。いずれの色彩変化もほぼ類似していた。

(4) TLC を用いて, 各製品の評価を行った (Fig. 5)。加水分解前の黄色スポットを観察した場合, A694 ではクロシン類の異性体が R_f 値 0.86~0.93 の範囲で観察された。一方で, A12 の製剤では, すでに加水分解されているものと思われ, R_f 値 0.56 付近のみのクロセチン由来スポットのみ観察された。また, サフラン色素では, A694 と同等のスポットが観察された。その後, アルカリ分解した後, TLC の評価を行った結果, いずれの製品においても, R_f 値 0.54 付近のクロセチン由来のスポットのみ観察された。

(5) HPLC により, クチナシ黄色素およびサフラン色素中のゲニポシドに関して, 分析を行った。その際のクロマトグラムを Fig. 6 に示す。

本結果より, A694 では, 0.085% および A12 では, 0.005% となった。一方で, サフラン色素では, 不検出となった。本結果は, いずれも 8 版公定法に規定される 0.5% 以下となり, 適合範囲以内となった。

2. HPLC によるクロシン, クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析

8 版公定法により, 評価したクロシン, クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析法を検討した。その際のクロマトグラムを Fig. 7 に示す。A694 からは, 各種クロシンの異性体が検出され, 一部にクロセチンも確認された。一方で, A694 のアルカリ加水分解および A12 では, クロセチンのみが観察された。本結果は, 8 版公定法で行った (4) の結果を反映していた。Fig. 7-[A] に示す主な 3 つのピークは, *trans*-crocetin di(β -D-gentiobiosyl) ester (ピーク 1; 最大吸収波長: 442 nm, 保持時間: 7.8 min), *trans*-crocetin β -D-gentiobiosyl ester (ピーク 2; 最大吸収波長: 434 nm, 保持時間: 11.2 min) および *cis*-crocetin di(β -D-gentiobiosyl) ester (ピーク 3; 最大吸収波長: 442 nm, 保持時間 11.7 min) であった。それらの TOF/MS スペクトルでは, ピーク 1 は, m/z 999.283 $[M+Na]^+$, ピーク 2 は, m/z 837.522 $[M+Na]^+$ そして, ピーク 3 は, m/z 999.282 $[M+Na]^+$ が検出され, いずれも既報を参考として確認できた⁹⁾。アルカリ加水分解およびクチナシ黄色素 A12 製品におけるクロマトグラムでは, 主に 2 つのピーク 4 および 5 が検出された。それらの 2 つのピークは, *trans* および *cis*-crocetins (ピーク 4; 最大吸収波長: 422 nm, 保持時間: 14.4 min) および (ピーク 5; 最大吸収波長: 422 nm, 保持時間: 15.9 min) であった。本ピークは, いずれも TOF/MS において, m/z 329.441 $[M+H]^+$ が検出されている⁹⁾。

同一条件において, ゲニポシドおよびその分解物であるゲニピン (m/z 226.929, $[M+H]^+$) も測定することができた (Fig. 8)。

本手法を用いて, 8 版公定法で用いるアルカリ加水分解の条件検討を実施した。0.02 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (50°C) において, クチナ

シ黄色素 A694 を用いて、加水分解した結果、ピーク 1 (保持時間 : 7.8 min) および 4 (保持時間 : 14.4 min) の経時変化を示すことができた (Fig. 9-[A])。その結果、クロシンは、5 分程度で加水分解され、クロシンは、20~30 分程度で一定量を示すことが分かった。その一方で、不純物質であるゲニポシドは、120 分程度の経時により、ゲニピンへ分解することも判明した (Fig. 9-[B])。

3. クロセチンの単離精製

クロセチンを指標としたクチナシ黄色素の定量評価を行うため、アルカリ分解試料より、クロセチンの単離精製を行った。まずは、固相抽出法により抽出を行った。クチナシ黄色素製剤 0.1 g から、加水分解および固相抽出による濃縮精製により、得られた成分 8.4 mg を HSCCC に注入することとした。また、同時に HSCCC の 2 相溶媒系を検討することとした (Table 1)。その結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1% ギ酸水溶液 (7/3/5/5) を最適として利用することとした。本条件により、固定相の保持率は 88% となり、単離精製には、8 時間を費やした。その際のクロマトグラムを Fig. 10 に示す。クロマトグラムより、Fraction A および B をそれぞれ 2.0 および 1.2 mg 得ることができた。Fraction A を HPLC で測定した結果、クロセチン標準試料として利用できる成分が単離できた (Fig. 11)。しかしながら、*trans* 型クロセチンに対して、*cis* 型が 15% の割合で、異性化反応が生じることが分かった。いずれも HPLC で単離精製を行っても同様の反応 (変換効率) が起こり、常に 15% 程度の混合物となってしまった。しかしながら、他の不純物なども観察されず、安定なクロマトグラムを示したため、本試料を指標として、クチナシ黄色素の定量評価に用いることとした。

4. クロセチン指標によるクチナシ黄色素の定量評価

2 で開発した HPLC 法を用いて、3 で得た標準試料により、検量線を作成した結果、*trans*

型クロセチンにおいて、 $y=549.7x + 7374.6$ (相関係数 $r^2=0.998$) の検量線を得ることができた。本検量線を利用して、アルカリ分解後のクロセチン含有量は、A694 では 67.6%、A12 では 45.5% およびサフラン色素では 42.3% となった。

D. 考察

本研究では、8 版公定法を基盤に国内で流通するクチナシ黄色素 2 製品およびサフラン色素 1 製品の評価および新たな HPLC による一斉分析法の検討を実施し、試験法の妥当性および新たな問題点を検証した。8 版公定法の妥当性評価においては、国内流通のクチナシ黄色素 2 製品において、確認試験(1)~(4)まで適合することができ、不純物質であるゲニポシド濃度 0.5% 以下であった。つまり、製剤技術の異なるクチナシ黄色素 2 製品において、8 版公定法の適合することができる。その理由としては、A693 製品では、水または、エタノールで抽出したものと判断でき、加水分解前では、大部分がクロセチンとして存在しているため、TLC による評価(4)では、アルカリ分解が必要と判断された。一方で、A12 製品は、加水分解を経て得られる色素と判断でき、アルカリ加水分解前でもクロセチン由来の R_f 値 0.4~0.6 付近に黄色のスポットを認めることができる。つまり、両製品を一つの条件下で適合とする場合、アルカリ加水分解は必要な条件だと推定できる。しかしながら、サフラン色素も本試験法において、適合となる。サフラン色素では、主な成分がクロシン異性体であり、アルカリ加水分解することでクロシンへ変化し、8 版公定法の確認試験(1)~(4)にすべて適合してしまう。つまり、8 版公定法に基づく評価では、サフラン色素とクチナシ黄色素を区別することが不可能であった。そのため、サフラン色素を「クチナシ黄色素」と表示しても判断不可能であることが示唆される。山田らも同様の指摘をしており、その解決策として、クロシン、クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析を推奨している⁸⁾。

そこで、HPLC によるクロシン、クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析法を開発し、アル

カリ加水分解前後の評価を行った。逆相系グラジエントモードおよび DAD 検出法を利用することで、各成分の分離分析が達成できた。本試験法を用いて、クチナシ黄色素 A694 製品を分析した結果、様々なクロシン異性体が検出された。そのため、クロシン異性体を用いたクチナシ黄色素の指標とすることは、複数存在するため困難であると判断した。そこで、アルカリ分解後の A694 および A12 製品を測定した結果、ほぼ同様のクロマトグラムを得ることができ、*trans* 型クロセチンが最も有効に検出することができ、本化合物を指標とすることとした。そこで、HSCCC による *trans* 型クロセチンの単離精製を試みた。その結果、Fraction A として、*trans* 型クロセチンを得ることができた。しかしながら、*trans* 型クロセチンは、容易に *cis* 型へ 15% 程度変換してしまうことが判明した。その一方で、HSCCC を利用することで、他の不純物質なども含まず、*trans* 型 85% 純度で定量を行うこととした。その結果、アルカリ分解後のクロセチン含有量は、A694 では 67.6%、A12 では 45.5% およびサフラン色素では 42.3% となった。いずれにおいても、殆どその差は、見出すことができなかった。つまり、アルカリ分解の製剤に存在するクロセチン含量だけでは、クチナシ黄色素とサフラン色素を識別することが不可能であった。

また、ゲニポシドにおいては、クチナシ黄色素から僅かであるが検出することができた。その一方で、アルカリ加水分解すると、ゲニポシドのピークは減少し、新たにゲニピンのピークが検出された。つまり、加水分解過程において、ゲニポシドは、ゲニピンに変化することが判明した。ゲニピンは、アポトーシスの誘導¹⁰⁾や免疫系への影響¹¹⁾など薬理活性を有しており、安全性からもモニタリングが必要な物質である。8 版公定法では、不純物質として、ゲニポシドのみ規格となっている。その一方で、加水分解処理されているクチナシ黄色素製品では、ゲニポシドが適合 (0.5% 以下) であったとしても、そのすべてもしくは一部がゲニピンに分解されている可能性が予想される。しかし、現在の

8 版公定法では、その点について、判断することはできない。今後、ゲニピンを含めた不純物質試験が要求されるものと思われる。本研究より、以下の新たな問題点および提案ができると思われる。

E. 結論

国内流通のクチナシ黄色素製品の判断について、以下に示す。

8 版公定法の確認試験において、両製品（水もしくはエタノール抽出製品および加水分解製品）を同一条件において、判断可能である。

・クチナシ黄色素とサフラン色素の識別

8 版公定法の確認試験およびクロセチン指標による HPLC 法では識別不可能である。今後、クロシンもしくはクロセチン以外の成分を用いるなど、他の試験法が必要と判断できる。

・純度試験（ゲニポシド）の試験

8 版公定法の純度評価としては、クチナシ黄色素およびサフラン色素では適合と判断できた (0.5% 以下)。しかし、加水分解の過程でゲニポシドから薬理活性を有するゲニピンへ変化することが判明した。今後、ゲニピンに対する純度試験および国内流通製品での含有調査が必要だと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue, K., Tanada, C., Nishikawa, H., Matsuda, S., Tada, A., Ito, Y., Min, J. Z., Todoroki, K., Sugimoto, N., Toyo'oka, T., Akiyama, H. "Evaluation of Gardenia Yellow using crocetin from alkaline hydrolysis based on ultra high-performance liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography." *J. Sep. Sci.*, **37**, 3619-3624 (2014)