

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物ベニコウジ色素の成分規格の検討

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

要旨 第8版食品添加物公定書には、ベニコウジ色素（Monascus Color）が収載されている。また、日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」においては、ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）が収載されている。いずれも、主成分は、アンカフラビン類、モナスコルブリン類、キサントモナシン類とされているが、確認試験などでは、色彩の評価のみである。そこで、本研究では、それぞれの主成分を明確にし、それに基づく成分規格を検討することとした。ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素において、HPLC分析を実施した。その結果、ベニコウジ黄色素では、明確な2つのピークが検出されたが、ベニコウジ色素は、製品間により、明確なピークが検出されなかった。その後、HSCCCによる評価を行った結果、ベニコウジ黄色素では、キサントモナシンAおよびBが主成分として単離精製および同定が可能であった。一方で、ベニコウジ色素は、主な成分がフロント付近に溶出し、それらはHPLCによる評価も達成できなかった。そのため、今後は、ベニコウジ色素の明確な成分解析を進めることとする。

A. 研究目的

ベニコウジカビ（*Monascus purpureus*）は糸状菌であり、昔から沖縄などで、紅酒や豆腐のような発酵食品として利用されてきた。この菌が生産する赤色素は、既存添加物としても利用されており、主にかまぼこなどの練り製品に用いられている。ベニコウジ色素は、培養した紅麹カビをプロピレングリコールやエタノールなど水溶性の溶剤で抽出し、一般的にはアンカフラビン、モナスコルブリン（図1）を色素の主成分としている。一方で、近縁種のカビはシトリニンという哺乳類に対し毒性を示す物質を生産するため、その含有量の検討が必須として挙げられる。一方で、同様のベニコウジカビを微温時弱塩酸性エタノールで抽出し、中和して得られたものをベニコウジ黄色素としている。主色素はキサントモナシン類（図1：キサントモナシンAおよびキサントモナシンB）とされ、黄色を呈する。

第8版食品添加物公定書には、ベニコウジ色素（Monascus Color）が収載されている。確認試験では、主に色彩の評価のみであり、明確に主成分を定性し、分析するものとなっていない。また、純度試験では、シトリニンを0.2 μg/g以下と定め、HPLC法が規格化されている。主成分の定義は、アンカフラビン類およびモナスコルブリン類が記載されている。ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）は、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）に規格されているが、確認試験では色彩の評価のみである。シトリニンの純度評価に関しては、示されていない。主成分では、キサントモナシン類と示されている。以上より、いずれも同じベニコウジカビから生成される色素成分であるが、培地条件や抽出方法により、異なる成分が含有することが考えられ、早急に主成分の規格などを示す必要がある。

ベニコウジ色素を対象とした成分規格の評価法については、殆ど報告がない。Shiらは、

pH-sensitive UV-Vis absorption 法により，色彩を簡便に評価する方法を示している<sup>1)</sup>。また，分離技術による評価では，Watanabe らが，ミセル動電クロマトグラフィーにより，ベニコウジ色素の分解物である 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2(NHOH))を分析している<sup>2)</sup>。一方で，培地に添加するアミノ酸の種類により，ベニコウジカビから生産される色素成分が異なることを示す研究報告もある<sup>3)</sup>。さらに，近年では，新たなベニコウジカビから生成される色素成分も報告され，明確な成分解析が求められるようになってきた<sup>4)</sup>。そこで，本研究では，国内流通品であるベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素に関する色彩の成分規格および主成分の確定を検討することとした。

## B. 研究方法

ベニコウジ色素は，ヤエガキ発酵技研社製，グリコ栄養食品社製，三栄源エフエフアイ社製を用いた。ベニコウジ黄色素は，三栄源エフエフアイ社製を用いた。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

LC 装置：島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10A S システム

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge)，GLサイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

ベニコウジ色素の LC 分離分析：対象試料はアセトニトリル/メタノール混液 (50/50, V/V) により調製した。移動相には，0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1% ギ酸メタノール (B) を使用し，A/B : 45/55 を 1.5 分間維持し，その後，15 分にて A/B : 2/98 のグラジエント分析を行った。カラム：TSKgel ODS-100V column (4.6 × 150 mm, 3 μm, 東ソー社製) カラム温度：40 流速：1.0 mL/min 検出波長：200-550 nm (定量：500 nm) 注入量：10 μL

ベニコウジ黄色素の LC 分離分析：対象試料は水/メタノール混液 (30/70, V/V) により調製した。移動相には，0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1% ギ酸メタノール (B) を使用し，A/B : 70/30 をアイソクラティックにより，10 分間の分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (4.6 × 150 mm, 3 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-500 nm (定量：460 nm)

注入量：10 μL

ベニコウジ色素の HSCCC の分離分析：対象試料を上層および下層混合溶液 (50/50, V/V) に溶解した。二相溶媒系は，ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1% ギ酸水溶液 (4/5/4/5, V/V/V) を用いた。分離部は，Type-J コイルを用い，遠心スピードを 1000 rpm とした。また，コイル容量は，350 mL であり，固定相には，上層を充填した。移動相には下層を用い，流速 2.0 mL/min で送液した。

ベニコウジ黄色素の HSCCC の分離分析：対象試料を上層および下層混合溶液 (50/50, V/V) に溶解した。二相溶媒系は，酢酸エチル/n-ブタノール/水 (V/V/V) を用いた。分離部は，Type-J コイルを用い，遠心スピードを 1000 rpm とした。また，コイル容量は，350 mL であり，固定相には，上層を充填した。移動相には下層を用い，流速 2.0 mL/min で送液した。

## C. 研究結果

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は，いずれも国内で流通している試料を用いた。そこで，各試料について，第 8 版食品添加物公定書および 4 版自主規格の確認試験を実施した。その結果，国内流通品は，いずれも現在の規格基準に従うことが分かった (図 2：ベニコウジ色素の確認試験 (1) のみ示す，図 3：ベニコウジ黄色素の確認試験 (1) のみ示す)。

次に，HPLC による分離分析を実施した。規格

における色価では、ベニコウジ色素で波長 480 ~ 520 nm、ベニコウジ黄色素では、458 ~ 468 nm とされている。そこで、各モニタリングをいずれも規格基準内波長である 500 nm (ベニコウジ色素) および 460 nm (ベニコウジ黄色素) を含むフォトダイオードアレーにて検出した。その結果の HPLC クロマトグラムを図 4 (ベニコウジ色素) および図 5 (ベニコウジ黄色素) に示す。ベニコウジ色素は、各検体により、全く異なるクロマトグラムパターン (図 4) を示し、いずれも培養技術やベニコウジカビの種類などが異なり、得られている成分が異なることが疑われた。また、種別により HPLC による分離分析は非常に困難であるとも判断された。そのなかでも、試料 119 において、比較的明確な 4 つピークが観察された。それぞれの吸光光度スペクトルを測定した結果、いずれも 500 nm 付近に吸収極大波長をもつため、いずれもベニコウジ色素の成分であることが判明した (図 6)。一方で、ベニコウジ黄色素は、明確な 2 つのピークが観察され、いずれも色素成分である可能性が示唆された (図 5)。それらの吸光光度スペクトルにおいても、吸収極大波長が 400 nm 付近であり、ベニコウジ黄色の色素成分であることが示唆された (図 7)。

HPLC 法では、ベニコウジ色素の成分などが固定相カラムに吸着してしまい、良好な分離分析達成できなかったと推定される。また、ベニコウジ黄色素も同様に吸着成分が存在している可能性も否定できない。そこで、吸着などの影響を受けず、回収率が 100% の分離手法である高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いて、成分解析を実施することとした。HSCCC による分離検討を実施するためには、2 相溶媒系を決定しなければならない。そこで、ベニコウジ色素では、試料 119 のクロマトグラムで示される 4 ピーク (A~D) を用いて、分配係数を算出し、2 相溶媒を検討した。また、ベニコウジ黄色素では、明確に検出されている 2 ピークを用いて実施した。その結果、表 1 ではベニコウジ色素および表 2 ではベニコウジ黄色素の分配係数と分離度を示す。いずれも、分配係数 0.2 ~ 1.5 の間であり、分離度も 1.0 以上のものを選択し、

各分離の 2 相溶媒として決定した。

2 相溶媒系の検討条件を用いて、HSCCC の分離分析を実施した。その結果、図 8 (ベニコウジ色素) および図 9 (ベニコウジ黄色素) にそれぞれのクロマトグラムを示す。ベニコウジ色素については、主な色素成分 (赤色素) が、ソルベント付近に検出され、色彩より主成分である可能性が示された (図 8: 色彩成分 X)。また、その後、色彩のある成分が溶出し、それをまとめて獲得した (図 8: 色彩成分 Y)。色彩成分 X および Y を HPLC で分析した結果、色彩成分 X では、試料 119 のクロマトグラムで観察されたピーク A および B が検出されているが、明らかに大きなブロードの溶出成分が存在し、良好に評価できないことが判明した (図 10)。また、色彩成分 Y では、試料 119 で観察されたピーク C および D が観察された (図 10)。一方で、ベニコウジ黄色素は、我々の既報<sup>5)</sup>において、良好に各成分を単離精製することができた (図 11)。各成分を <sup>1</sup>H-NMR および LC-MS/MS (エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモードを採用した) を用いて、解析した結果、フラクション A が、キサントモナシン A およびフラクション B がキサントモナシン B であることが判明した (図 12)。

#### D. 考察

本研究では、ベニコウジカビ (*Monascus purpureus*) から生成されるベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素について、成分規格に伴う解析を実施した。ベニコウジカビは、育成する培地条件により様々な色彩成分を生成することや抽出条件により成分が異なることなどが報告されているため、国内流通品に関して、成分規格を定める必要がある。そこで、一般的に入手可能なベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の解析することとした。第 8 版食品添加物公定書および 4 版自主規格の確認試験では、主に色彩を評価するものであり、流通品ではすべて規格内であった。それらの製品を用いて、HPLC による色彩成分の評価を実施した。その結果、ベニコウジ色素の製品間において異なるクロマトグラムパターンを示し、色彩成分の

違いなどが示唆された。そのうえ、様々な分離条件を検討したが、すべてに対して、良好なピーク分離が得られず、HPLCによる評価は難しいことが判明した。一方で、ベニコウジ黄色素では、明確な2本のピークが観察された。しかしながら、それ自体が色彩の主成分とは断定することは難しく、色彩成分の回収率が100%であるHSCCCによる分離評価が必要であることが分かった。HSCCCでは、分配係数を算出しなければならず、ベニコウジ色素(ピークA~D)およびベニコウジ黄色素(ピークE,F)のHPLC分析によるピークを基準に2相溶媒系を決定した。その結果、HSCCCの評価により、ベニコウジ色素において、色彩成分はフロント付近に大きく検出され、分配係数から想定される色彩ピークは後ろに溶出してきた。しかしながら、それをHPLCにより評価した結果、主な色彩成分のピークを定めることができなかった。一方で、ベニコウジ黄色素は、HSCCCにより、良好に単離精製することでき、それぞれをキサントモナシンAおよびキサントモナシンBと同定することができた。

#### E. 結論

本結果より、既存添加物ベニコウジ色素とベニコウジ黄色素の成分規格案について、主成分も含めて再検討する必要性が挙げられた。そのためには、今後、他の流通品も含めて、自主規格案との比較検討を進める必要があると結論付けた。本研究からの結論は下記に示す。

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、培地条件や抽出条件により、全く色彩成分が異なり、明確な主成分を同定し、それに基づく規格基準が必要と考えられた。

ベニコウジ色素：赤色の主な成分は、HPLCによる評価は困難であり、今後、HSCCCなどを利用した主成分の同定が必要であり、それに基づく、試験の提案も求められる。

ベニコウジ黄色素：主にキサントモナシンAおよびキサントモナシンBが主成分と想定される。

しかしながら、いずれの標準品も入手困難であるため、今後、その含量分析に関して、検討する必要がある。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
特になし

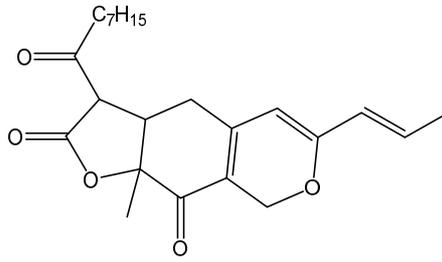
2. 学会発表  
特になし

G. 知的財産権の出願、登録状況  
特になし

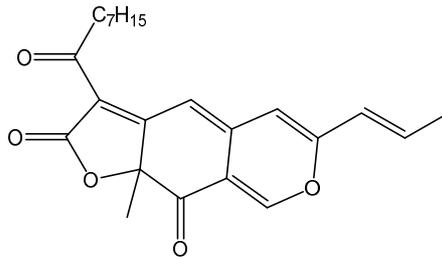
H. 健康危機情報  
特になし

#### I. 参考文献

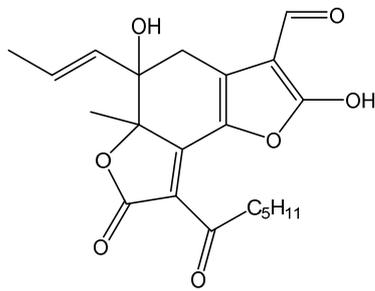
- 1) Shi K, Chen G, Pistolozzi M, Xia F, Wu Z.; *Food Addit. Contam. Part A* 33, 1396-1401. (2016)
- 2) Watanabe T, Mazumder TK, Yamamoto A, Nagai S, Arimoto-Kobayashi S, Hayatsu H, Terabe S.; *Mutat Res.* 444, 75-83. (1999)
- 3) Jung H, Kim C, Kim K, Shin CS.; *J. Agric. Food Chem.* 51, 1302-1306. (2003)
- 4) Kongruang S.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 93-99. (2011)
- 5) Inoue K, Ito Y, Hattori Y, Tsutsumiuchi K, Ito S, Hino T, Oka H; *Jpn. J. Food Chem. Safety* 17, 185-191. (2010)
- 6) Yamaguchi K, Kurata S; *Bunseki Kagaku* 54, 1091-1100. (2005).
- 7) Górnas P, Siger A, Pugajeva I, Segliņa D; *Food Addit. Contam. Part A* 31, 567-573. (2014).



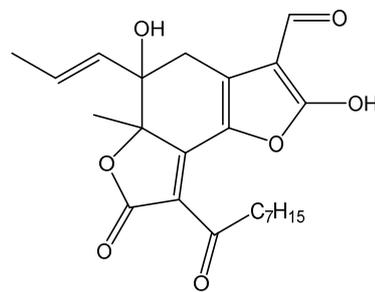
Ankaflavin



Monascorubin

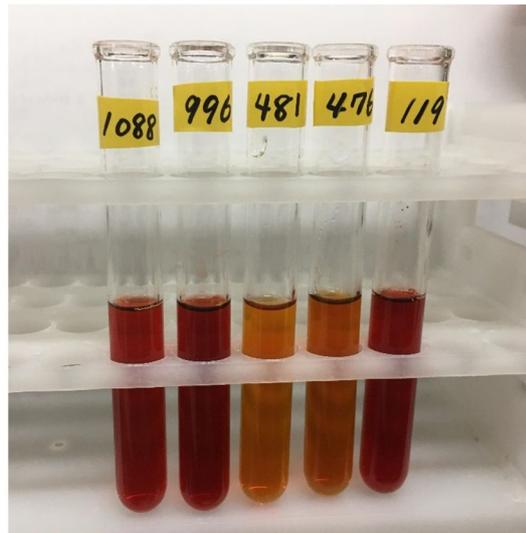


Xanthomonascin A



Xanthomonascin B

図1 ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の主成分と定義される化合物



- 1088 ベニコウジ色素アンカレッド Alc300ヤエガキ発酵技研(株)
- 996 ベニコウジ色素 グリコ栄養食品(株)
- 481 ベニコウジ色素 ヤエガキ発酵技研(株)
- 476 ベニコウジ色素モナスカラー300LND グリコ栄養食品(株)
- 119 ベニコウジ色素(粉末タイプ) 三栄源FFI(株)

確認試験(1)

図2 ベニコウジ色素の確認試験



黄色



蛍光の緑色



黄色

NaOH



赤褐色

### 確認試験(1)

### 確認試験(2)

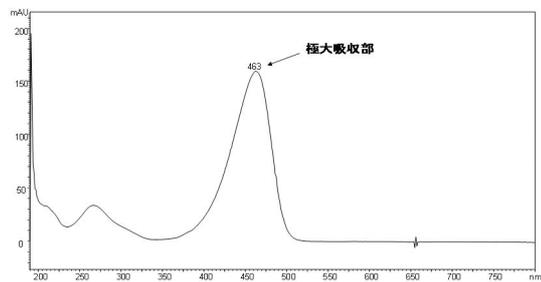


硫酸



黄色の濁り

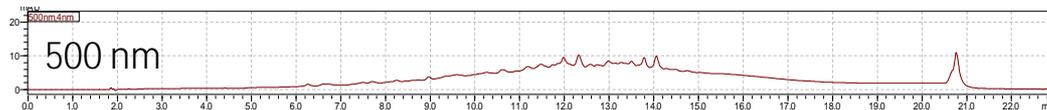
### 確認試験(3)



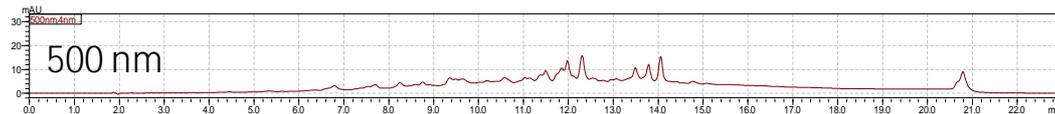
### 確認試験(4)

図3 ベニコウジ黄色素の確認試験

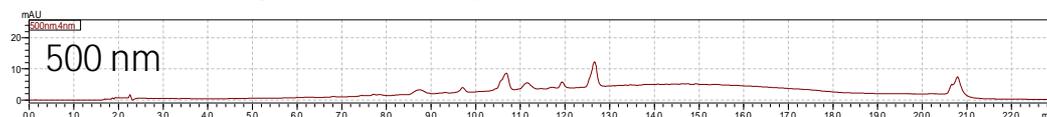
1088 ベニコウジ色素アンカレッド Alc300ヤエガキ発酵技研(株)



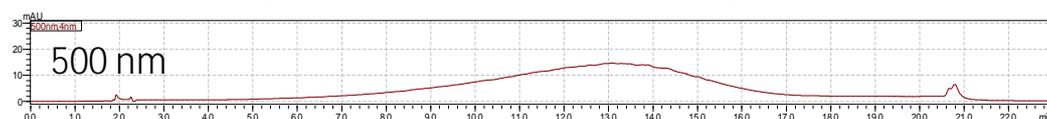
996 ベニコウジ色素 グリコ栄養食品(株)



481 ベニコウジ色素 ヤエガキ発酵技研(株)



476 ベニコウジ色素モナスカラー300LND グリコ栄養食品(株)



119 ベニコウジ色素(粉末タイプ) 三栄源FFI(株)

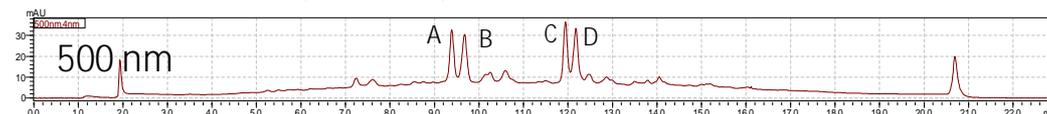


図4 ベニコウジ色素の HPLC クロマトグラム

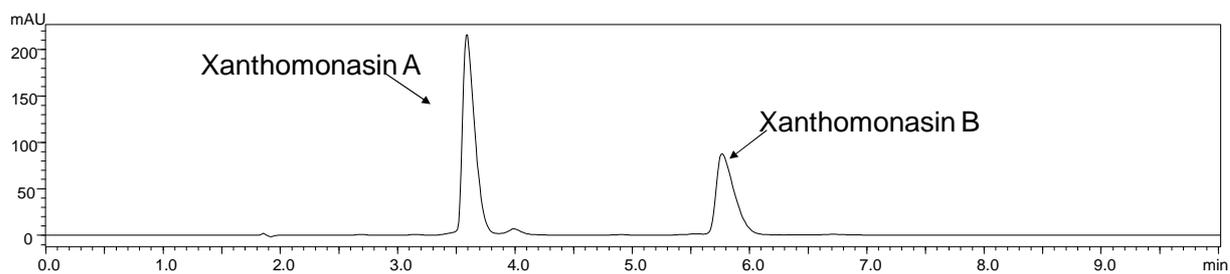


図5 ベニコウジ黄色素の HPLC クロマトグラム

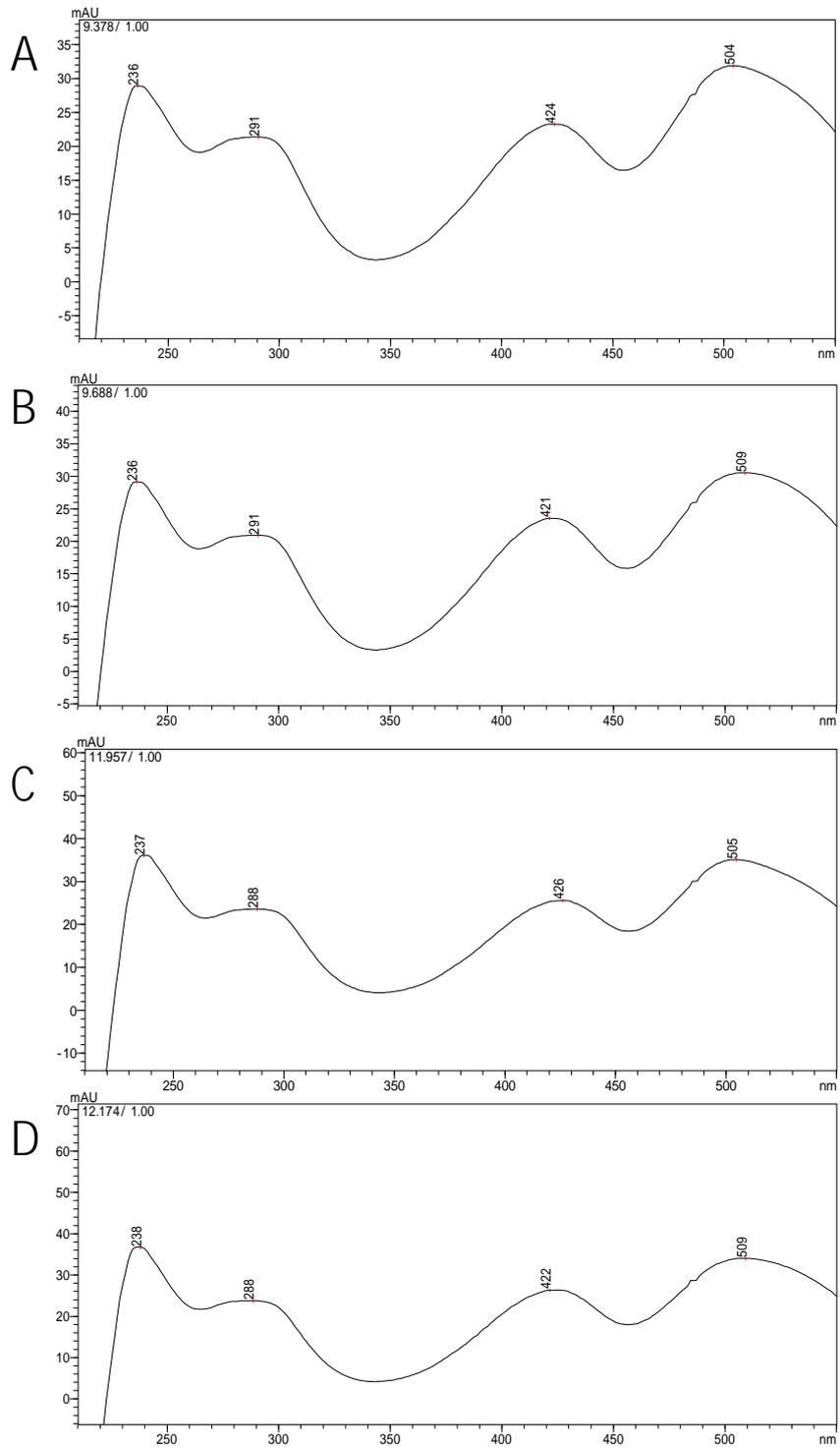


図6 ベニコウジ色素(試料119)の検出ピークA~Dの紫外可視スペクトル

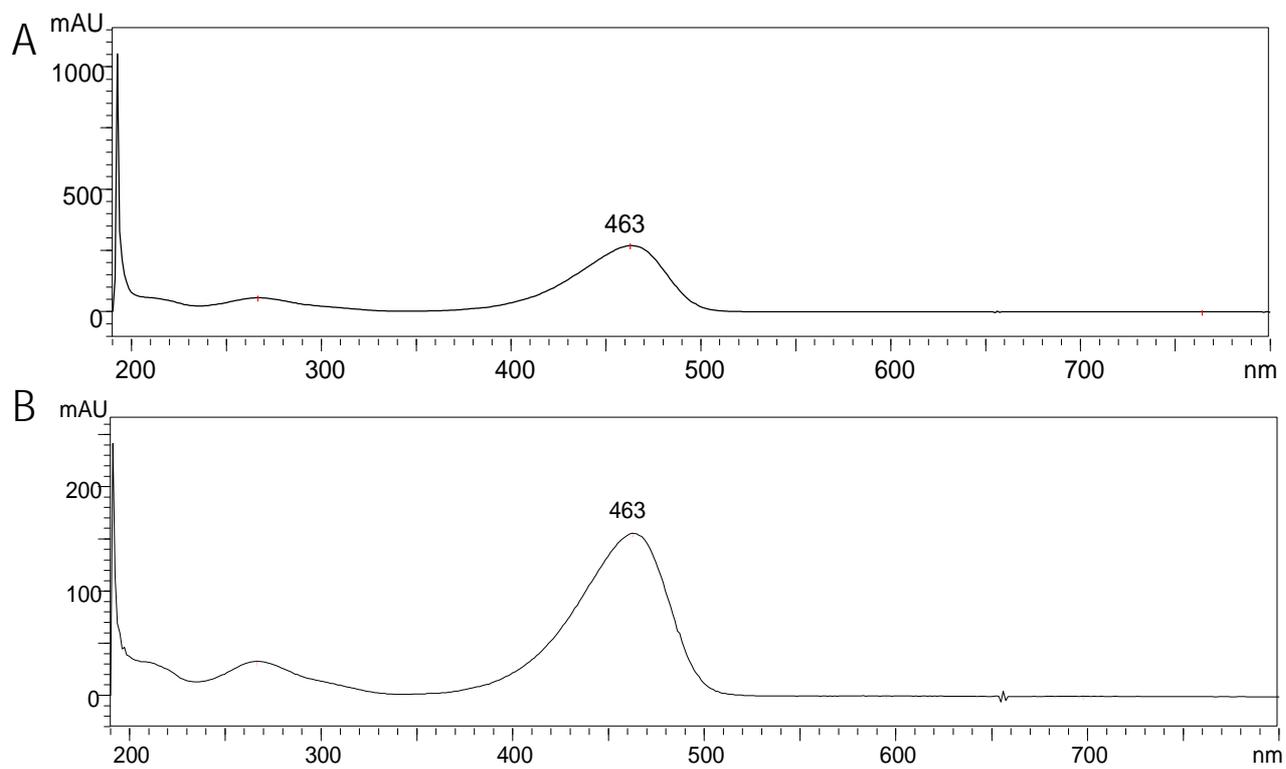


図7 ベニコウジ黄色素の検出ピークの紫外可視スペクトル

A: キサントモナシン A

B: キサントモナシン B

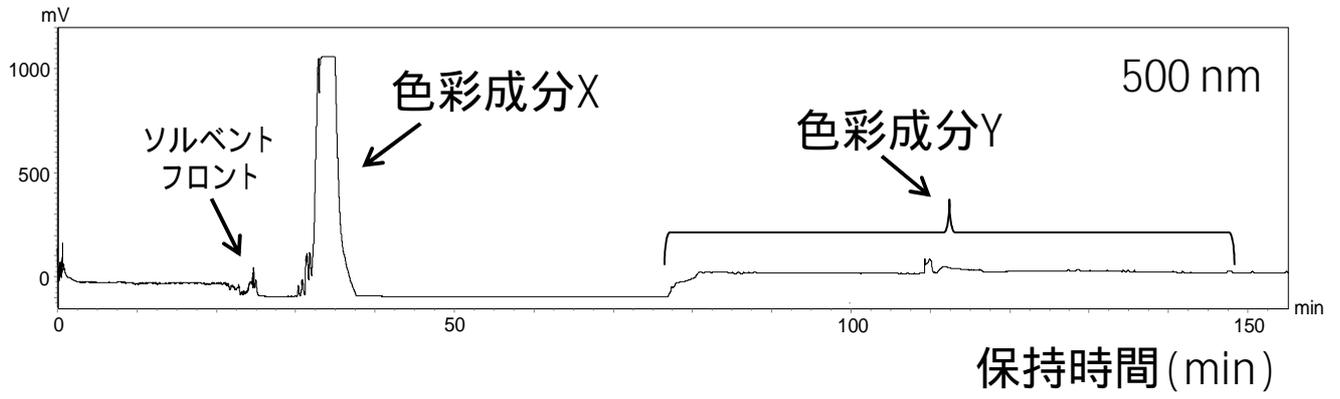


図8 ベニコウジ色素(試料119)のHSCCCクロマトグラム

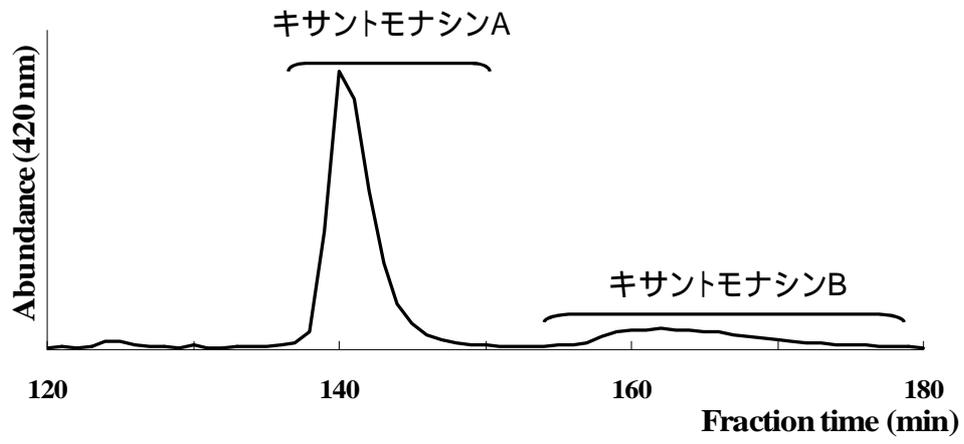


図9 ベニコウジ黄色素の HSCCC クロマトグラム

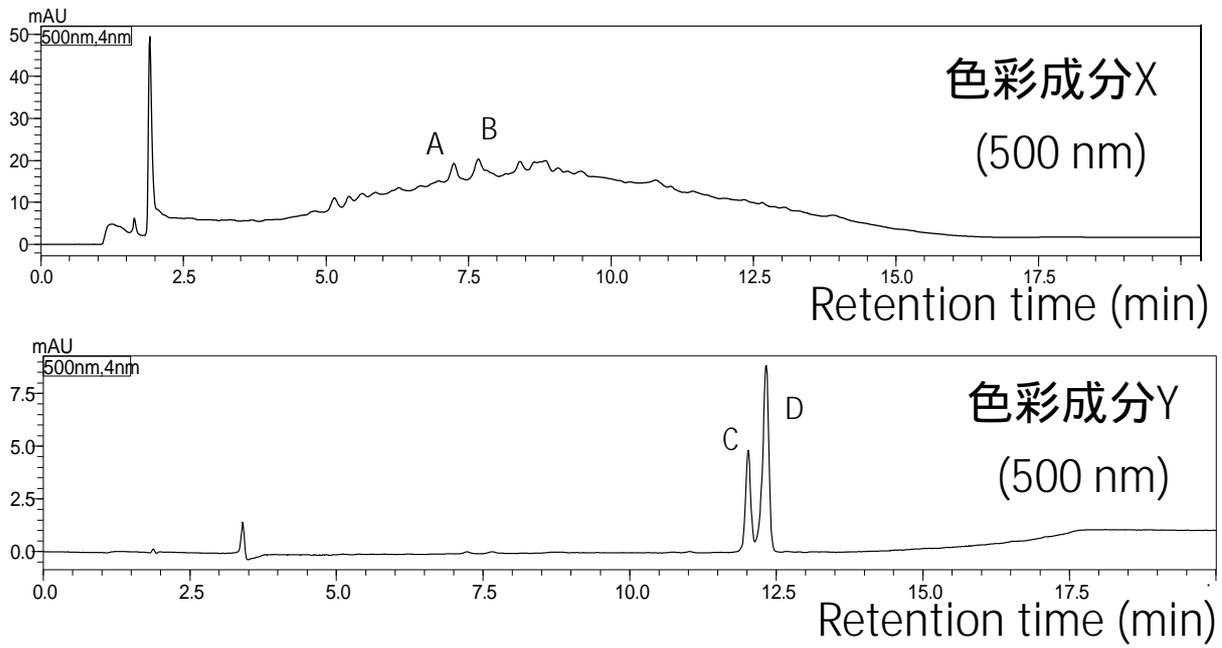


図 10 ベニコウジ色素 (試料 119) から分取した色彩 X および Y の HPLC クロマトグラム

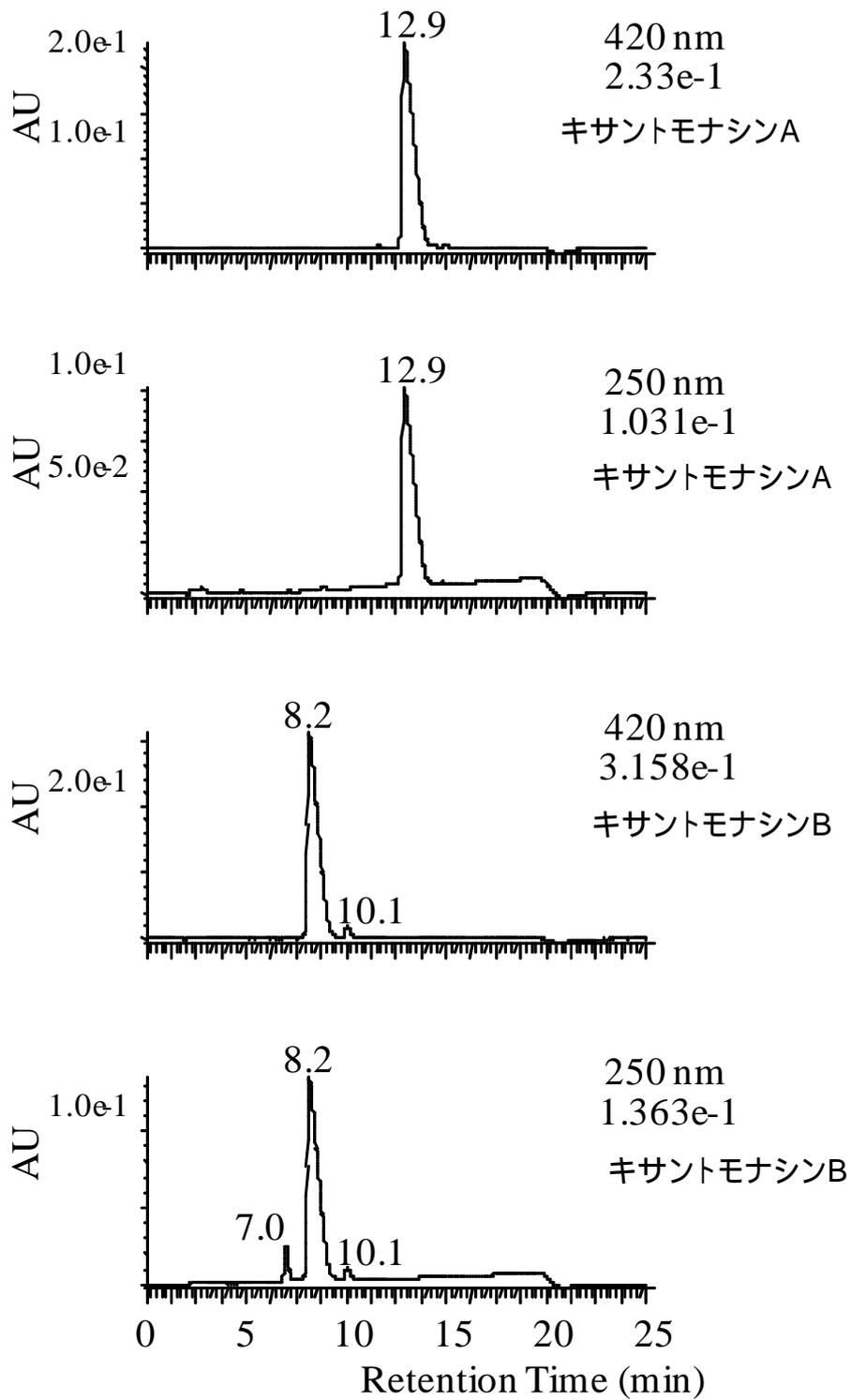


図 11 ベニコウジ黄色素のキサントモナシン A および B の HPLC クロマトグラム<sup>5)</sup>

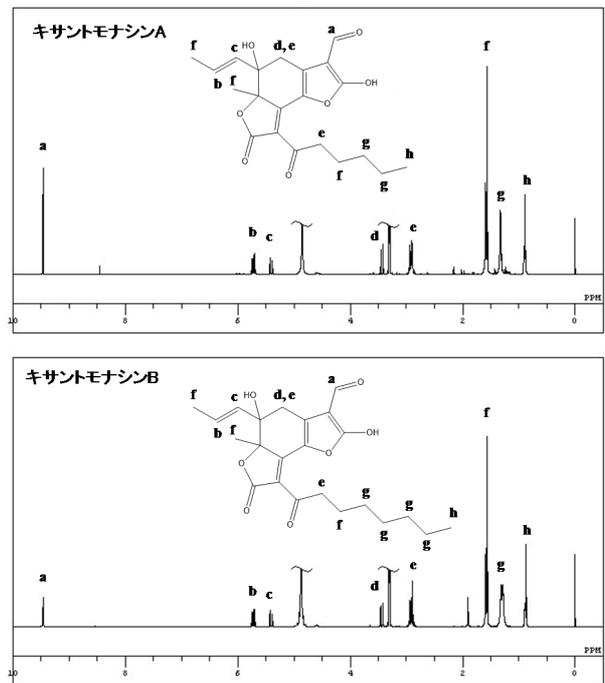
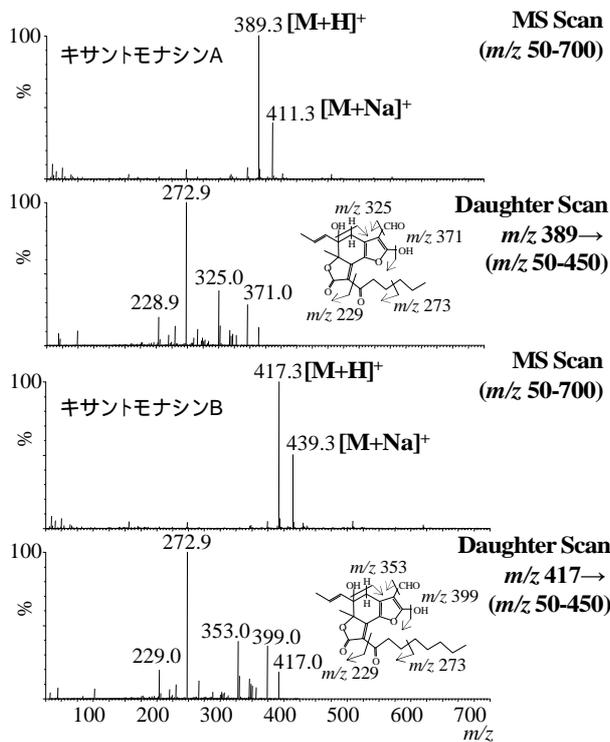


図 12 キサントモナシン A および B の同定データ (MS/MS および NMR) <sup>5)</sup>

表1 ベニコウジ色素の各成分 (A~B) における分配係数と分離度

Hexane	Ethyl Acetate	Butanol	Two-solvent system			Ka ± SD				Separation factor	
			Methanol	Water	0.1% FA in water	A	B	C	D	A/C	B/D
0	5	0	0	5	0	0.21±0.01	0.18±0.01	1.56±0.27	1.38±0.22	7.43	7.67
0	4	1	0	5	0	0.36±0.01	0.32±0.01	2.59±0.08	2.16±0.04	7.19	6.75
0	3	2	0	5	0	0.80±0.01	0.83±0.01	4.64±0.12	3.98±0.11	5.80	4.80
5	5	0	5	0	5	0.06±0.02	0.06±0.02	0.19±0.05	0.18±0.04	3.17	3.00
4	5	0	4	0	5	0.29±0.03	0.26±0.03	0.77±0.10	0.72±0.09	2.66	2.77
3.5	5	0	3.5	0	5	0.44±0.02	0.40±0.01	1.41±0.07	1.32±0.06	2.59	3.30
3	5	0	3	0	5	1.11±0.04	1.07±0.07	4.34±0.25	4.27±0.21	3.91	3.99

表2 ベニコウジ黄色素のキサントモナシン A および B の分配係数と分離度

酢酸エチル/n-ブタノール/水	Xanthomonasin A	Xanthomonasin B	分離度( $\alpha$ )
	分配係数(K)	分配係数(K)	
5/0/5	0.01(±0.00)	0.10(±0.01)	6.71(±0.11)
4/1/5	0.30(±0.03)	1.62(±0.15)	5.45(±0.06)
3/2/5	2.03(±0.24)	8.94(±1.38)	4.40(±0.17)
2/3/5	5.11(±0.61)	18.92(±1.61)	3.72(±0.14)
1/4/5	8.95(±0.47)	27.13(±0.40)	3.02(±0.40)
5/0/5	11.33(±0.77)	34.21(±2.17)	0.27(±0.10)