

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の含有成分解析に関する研究

～既存添加物ゴマ油不けん化物の成分規格の検討～

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

**研究要旨** 昨年度に引き続き、日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」に記載されているゴマ油不けん化物の成分規格の検討を実施した。ゴマ油不けん化物は、ゴマ (*Sesamum indicum* Linné) の種子から得られた、セサミン及びセサモリンを主成分であると定義された。しかし、これらの標準品は高価格であり、定量評価が困難である。そこで、相対モル感度係数を用いたシングルリファレンスHPLC定量法を構築した。さらに、本手法をゴマ油不けん化物の試験法のみならず、様々なゴマ油由来製品に関する定量評価へ応用するため、分析対象をセサモール、セサミン、エピセサミン及びセサモリンとした。本手法では、ゴマリグナン類と極大吸収波長が類似であるシングルリファレンス（ピペロナル、セサモールのメチル誘導体、ブチル誘導体及びヘキシル誘導体）をデザインし、定量の妥当性を検討した。その結果、ピペロナル、セサモールのメチル誘導体及びブチル誘導体において、絶対検量線法と同等の定量性を示し、異なる分析条件でも高い再現性を保証することが確認された。

## A. 研究目的

ゴマ油不けん化物(Sesame Seed Oil Unsaponified Matter)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）に規定されている。ゴマ油不けん化物の定義は、ゴマ (*Sesamum indicum* Linné) の種子から得られた、セサモリンを主成分とするものである<sup>1)</sup>。確認試験では、順相系液体クロマトグラフィーによる測定であったが、逆相系液体クロマトグラフィーにおいても分離分析が可能であった。また、成分解析では、セサミンおよびセサモリンが主成分であり、セサモールは本品の不純物であることが確認できた。以前では、逆相系液体クロマトグラフィーを用いた成分規格の設定を行い、その評価を実施したが、分析を行う上で高純度な標準品が必要となった。しかし、セサミンおよびセサモリンの標準品は高額であり、入手困難となっている。そこで、簡便かつ効率的な高速向流クロマトグラフィー(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)による単離精製を試み

た<sup>2-3)</sup>。二相溶媒系にはヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水溶液(7/3/7/3, v/v/v/v)を用いた結果、高純度のセサミンおよびセサモリンを単離精製することができた<sup>4)</sup>。

本年度では、ゴマ油不けん化物だけでなく、様々なゴマ関連食品に応用できる定量評価法を検討した。その方法として、相対モル感度係数(Relative Molar Sensitivity, RMS)を用いたシングルリファレンスHPLC定量法を構築することとした。本手法は、RMSとピーク面積比により分析対象物質を間接的に定量することが可能である。つまり、RMSを設定することにより、分析対象物質の標準品に頼らず定量可能な簡便かつ迅速な方法といえる<sup>5)</sup>。本研究における分析対象は、ゴマリグナン類のセサモール、セサミン、エピセサミンおよびセサモリンとした(Fig. 1)。さらに、ゴマリグナン類と同等の極大吸収波長を持つ化合物をシングルリファレンスとして採用するため、ゴマリグナン類と共通構造を持つ類似化合物を有機合成にてデザインすることを試みた<sup>6)</sup>。デザインした4種類のシ

シングルリファレンスを用いて、保持時間や定量の妥当性を比較し、ゴマリグナン類の最適なシングルリファレンス定量法を検討することとした。

## B. 研究方法

ゴマ油不けん化物は国内で市販されているものを用いた。ゴマ油はかどや製油社製、セサミン EX はサントリーウエルネス社製を購入した。

電子天秤：メトラ製 METTLER ML303/52

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

定量 NMR 装置：日本電子社製 JMM-ECA 600MHz

ゴマリグナン類のおよびシングルリファレンス 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% ギ酸アセトニトリル (B) を使用し、A/B：55/45 のアイソクラティック分析を行った。

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

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

検出波長：190-800 nm (定量：290 nm)

注入量：10 μL

ゴマリグナン類に対するシングルリファレンスのデザイン：セサモールにヨードメタン、1-ブロモブタン、1-ブロモヘキサンを反応させ、メチル誘導体、ブチル誘導体およびヘキシル誘導体を合成した。触媒として、炭酸カリウムを使用した。また、流通されているゴマリグナン類の類似化合物として、ピペロナルも用いた。

定量 NMR による純度評価：試料として、セサモール、セサミンおよびピペロナルは和光純薬社製、エピセサミンおよびセサモリンはナカライテスク社製、メチル誘導体、ブチル誘導体およびヘキシル誘導体は本研究にて合成したものをを用いた。

データ数：60,000

パルス角：90°

遅延時間：60 秒

繰り返し回数：8~16 回

観測幅：-5~15 ppm

溶媒：重クロロホルム

RMS の算出：4 種のゴマリグナン類および 4 種のデザインしたシングルリファレンスについて、0~100 μM で絶対検量線を作成した。各シングルリファレンスに対するゴマリグナン類の検量線の傾きの比より、RMS を算出した。

シングルリファレンス HPLC 定量法の妥当性評価：求めた RMS を用いて、絶対検量線法との定量値を比較した。また、異なる分析条件 (カラムや移動相) でのシングルリファレンス HPLC 定量法での定量性を検討した。用いたカラムは TSKgel ODS-100V (東ソー社製)、XBridge C18 (Waters 社製)、Inertsil ODS-2 (GL サイエンス社製)、YMC-Pack Pro C18 (YMC 社製) および KINETEX (Phenpmex 社製) である。さらに、添加するシングルリファレンスを 25 μM, 50 μM と 100 μM の 3 種類の異なる濃度において定量値の再現性を確認した。

## C. 研究結果

HPLC による分離分析を実施した。各モニタリングする波長を決定するため、ゴマリグナン類をフォトダイオードアレーにて検出した。その結果の HPLC クロマトグラムをおよび紫外可視吸収スペクトルを Fig. 2 および 3 に示した。

ゴマリグナン類に対するシングルリファレンスをデザインし、有機合成を実施した。セサモールをアルキル化し、メチル誘導体、ブチル誘導体やヘキシル誘導体を合成した (Fig. 4)。さらに、セサモールの類似化合物としてピペロナルもシングルリファレンスとして検討することとした。なお、デザインしたシングルリファレンスにおいても、LC の分離分析を行い、各 HPLC クロマトグラムおよび紫外吸収スペクトルを得た (Fig. 5 および 6)。

ゴマリグナン類およびシングルリファレンスを定量 NMR にて純度評価した。その結果を Fig.7 および Table 1 に示し、いずれも 97% 以上の高純度であることが確認された。

定量 NMR によって得られた定量値をもとに、各ゴマリグナン類およびシングルリファレンスの 0~100  $\mu\text{M}$  の絶対検量線を作成した (Fig.8)。各シングルリファレンスに対するゴマリグナン類の検量線の傾きの比より、RMS を算出し Table 2 に示した。なお、セサモールのヘキシル誘導体は感度が低く、20~100  $\mu\text{M}$  の範囲でしか検量線を作成できなかった。

次に、シングルリファレンス定量法で得られたゴマリグナン類の定量値と従来の絶対検量線法による定量値を比較し、本手法の妥当性を検討した結果を Table 3 に示す。ヘキシル誘導体はゴマリグナン類と大幅に保持時間がずれており、定量性に乏しく、シングルリファレンスとして不適合であると判断した。

また、5 種の異なるカラムや移動相を用いて、各ゴマリグナン類の定量値を算出した。各カラムでの HPLC クロマトグラムと各定量値を Fig.9~13 と Table 4~7 に記した。その結果、どのカラムを用いても、再現性の高い定量値が得られた。特に、セサモールのブチル誘導体が最もシングルリファレンスの中で RSD% の小さく良好な値を示した。

#### D. 考察

本研究では、ゴマ油不けん化物 (Sesame Seed Oil Unsaponified Matter) に含まれるセサミンおよびセサモリンの規格試験の検討、それらに加えて、ゴマ関連製品に含まれる他のゴマリグナン類であるセサモールおよびエピセサミンにおいて新たな定量評価法を構築した。ゴマリグナン類は標準品の価格が高く、入手困難であり、簡便かつ安価な定量法が求められていた。そこで、分析対象の標準品を用いない、RMS を用いたシングルリファレンス HPLC 定量法を新たに構築した。本研究では、ゴマリグナン類に類似構造をもつシングルリファレンスを得るために、セサモールのアルキル化によりデザインした。

それにより、シングルリファレンスとして、セサモールのメチル誘導体、ブチル誘導体、ヘキシル誘導体およびピペロナール (セサモールの類似化合物) を検討した。4 種のゴマリグナンおよびシングルリファレンスに関して、絶対検量線の傾きの比より RMS を求めた結果、どの濃度幅においても再現性の高い RMS が得られた。算出した RMS を用いて絶対検量線法と比較した結果、ヘキシル誘導体での定量値はばらつきが大きく、ピペロナールは最も定量性が高いことが確認された。また、カラムや移動相の条件を変更し、シングルリファレンス HPLC 定量法を検討した結果、いずれも RSD 5% 以下のゴマリグナン類の定量値が得られ、その中でセサモールのブチル誘導体が最も RSD の低い定量値を示した。ゆえに、本手法により、シングルリファレンスを用いることで、4 種類のゴマリグナン類を標準品なしで一斉定量することができた。本結果より、吸収極大も同じであるブチル誘導体が最適なゴマリグナン類のシングルリファレンスであるといえる。

#### E. 結論

本結果より、ゴマリグナン類 (セサモール、セサミン、エピセサミンおよびセサモリン) は RMS によるシングルリファレンス HPLC 定量法により既存添加物ゴマ油不けん化物だけでなく、ゴマ関連製品において安価かつ簡便に定量することができることが確認された。下記にその条件を示す。しかし、ゴマ油不けん化物やゴマ関連製品に唯一セサモールが含まれておらず、こちらの定量評価を実施する必要があると考えている。

シングルリファレンス HPLC 定量法の条件

移動相 : A/B=0.1%ギ酸メタノール/0.1%ギ酸水溶液

流速 : 1.0 mL/min

対象化合物 : セサモール、セサミン、エピセサミン、セサモリン

シングルリファレンス : セサモールのブチル誘導体

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし

### 2. 学会発表

高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: シングルリファレンス定量分析: 相対モル感度係数に基づく新たな HPLC 定量法の開発とゴマリグナンへの応用 日本薬学会第 138 年会 (金沢), 2018 年 3 月

## G. 知的財産権の出願, 登録状況

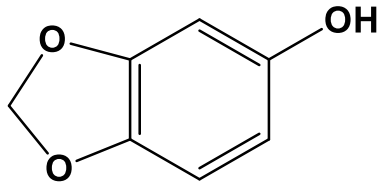
特になし

## H. 健康危機情報

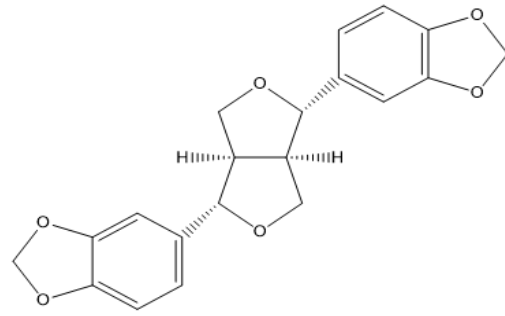
特になし

## I. 参考文献

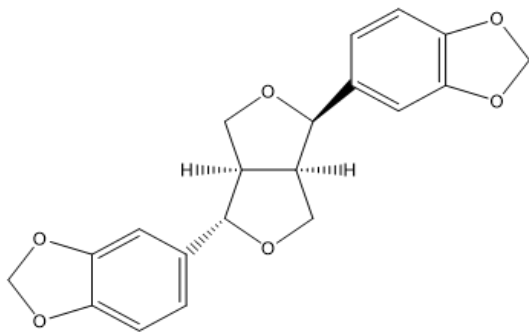
- 1) 日本食品添加物協会 ; 第 4 版 既存添加物自主規格 平成 20 年 10 月 13 日発行
- 2) Wang X, Lin Y, Geng Y, Li F, Wang D; *Cereal Chem.* 86, 23-25. (2009)
- 3) Jeon JS, Park CL, Syed AS, Kim YM, Cho IJ, Kim CY; *J. Chromatogr. B* 1011, 108-113
- 4) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Takeuchi H, Nakagawa K, Akiyama H, Sato K, Inoue K ; *J.Sep.Sci.* 39, 3898-3905 (2016)
- 5) Nishizaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Sugimoto N, Numata M, Ihara T; *Anal. Chem.* 89, 6963-6968 (2017)
- 6) Paul FS, William A; *J. Org. Chem.* 52, 1972-1979 (1987)



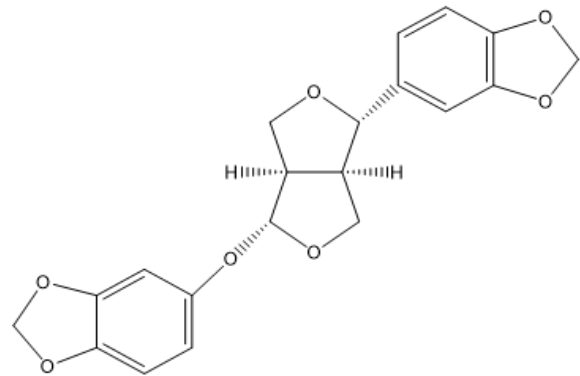
セサモール



セサミン



エピセサミン



セサモリン

Fig.1 ゴマリグナン類の構造

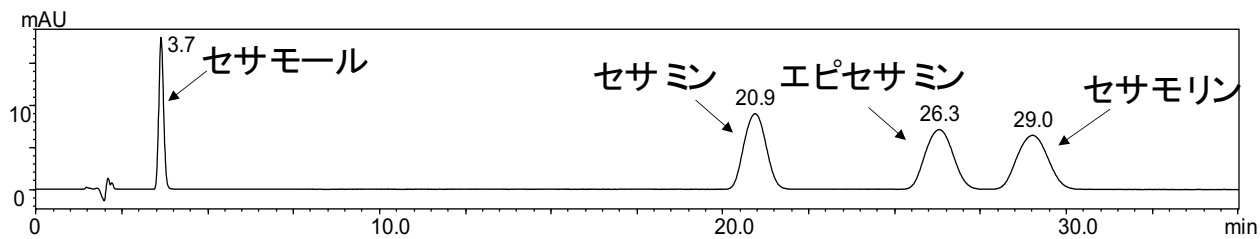


Fig. 2 ゴマリグナン類の HPLC クロマトグラム (検出波長：290 nm)

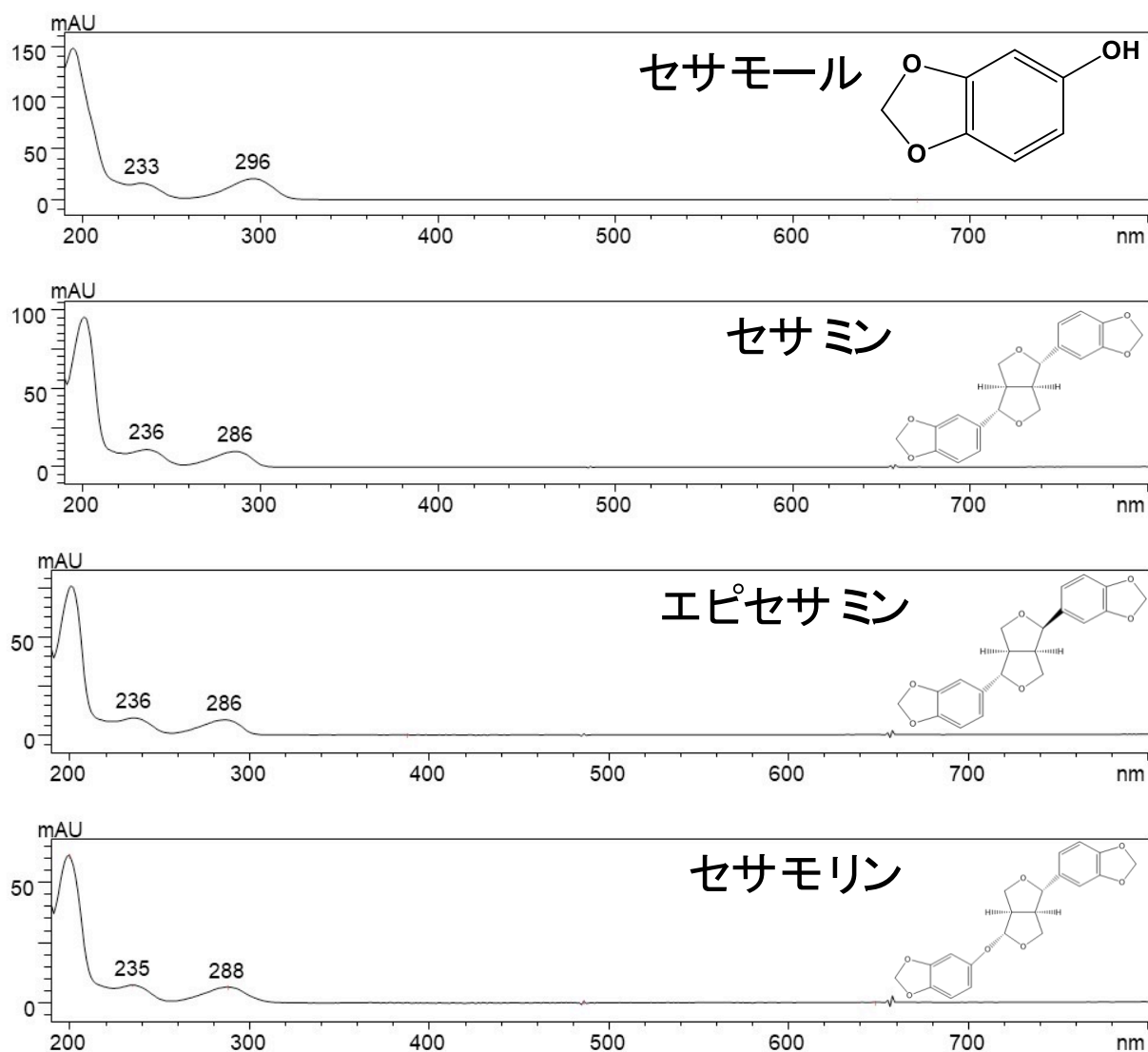


Fig. 3 ゴマリグナン類の紫外可視吸収スペクトル

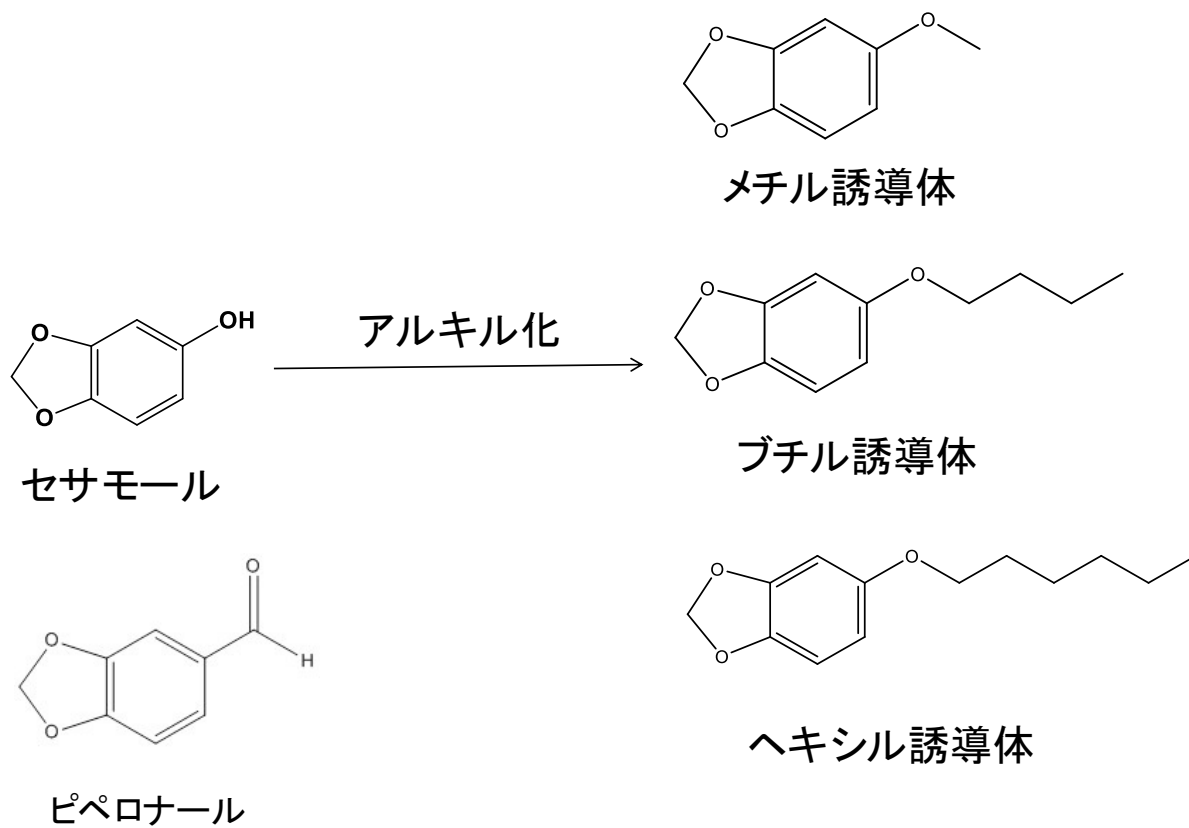


Fig. 4 シングルリファレンスの有機合成デザイン

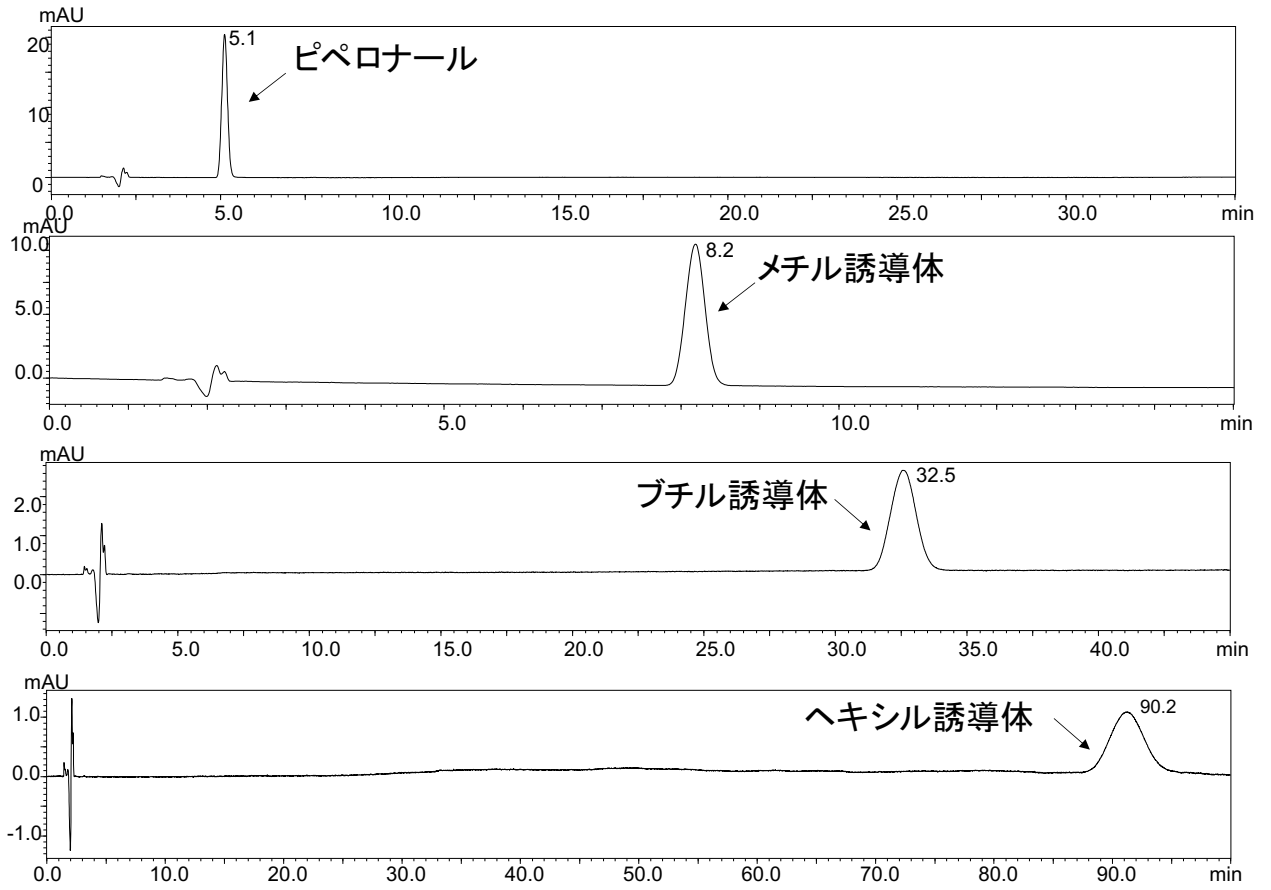


Fig.5 シングルリファレンスの HPLC クロマトグラム (検出波長 : 290 nm)



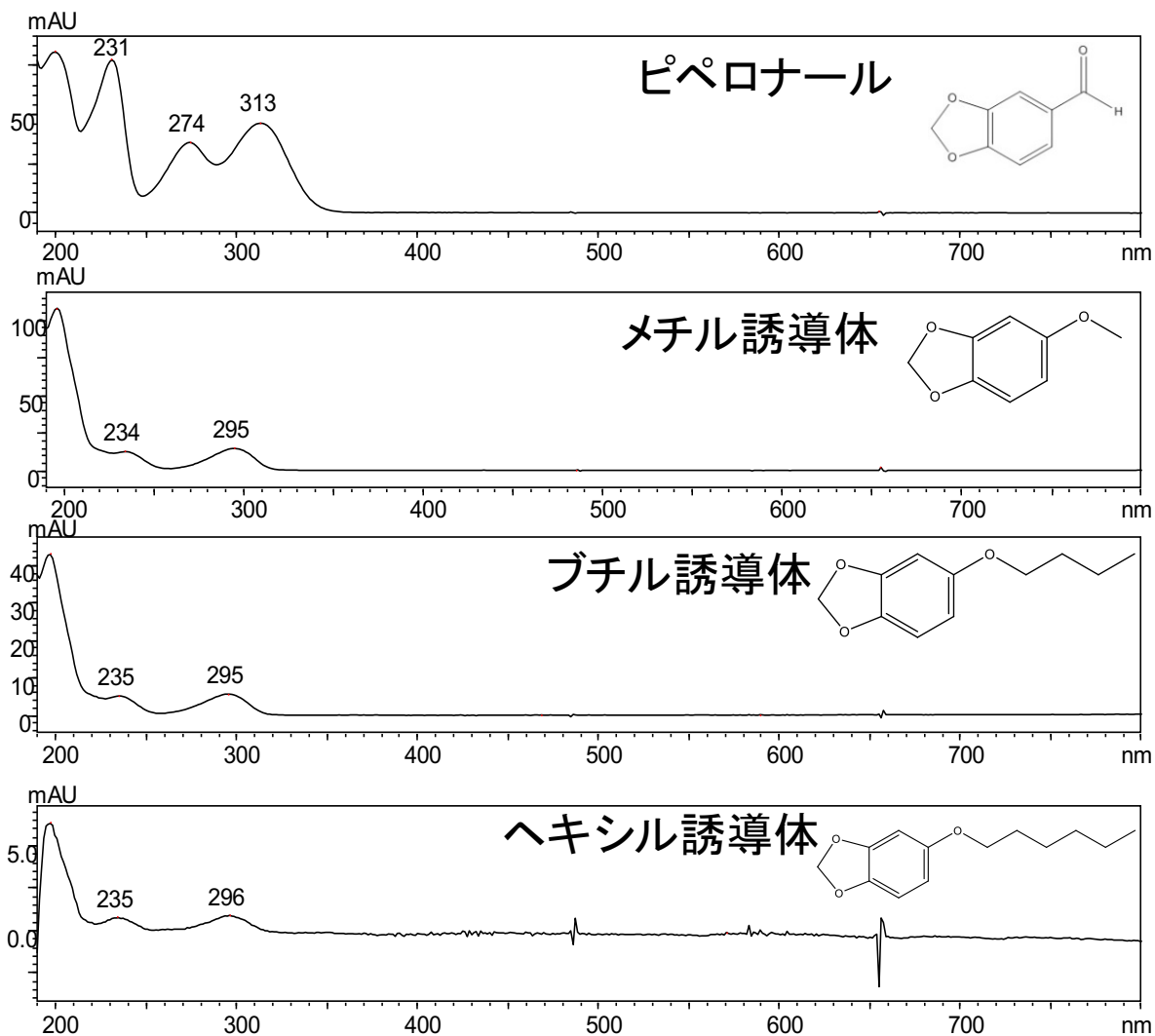


Fig.6 シングルリファレンスの紫外可視吸収スペクトル

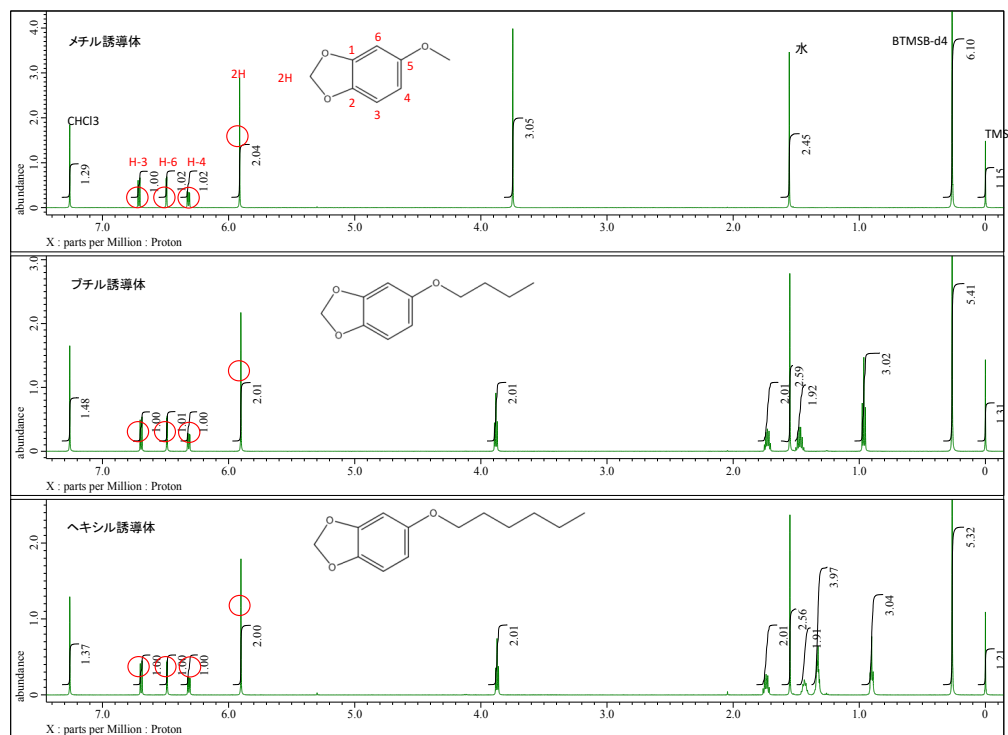


Fig. 7 デザインしたシングルリファレンスのNMR スペクトル

Table 1 定量NMRにおける純度評価

		含有量%
シングル リファレンス	ピペロナール	98.4
	メチル誘導体	97.3
	ブチル誘導体	98.1
	ヘキシル誘導体	97.6
ゴマリグナン類	セサモール	98.5
	セサミン	99.4
	(+)-エピセサミン	99.2
	(+)-セサモリン	98.5

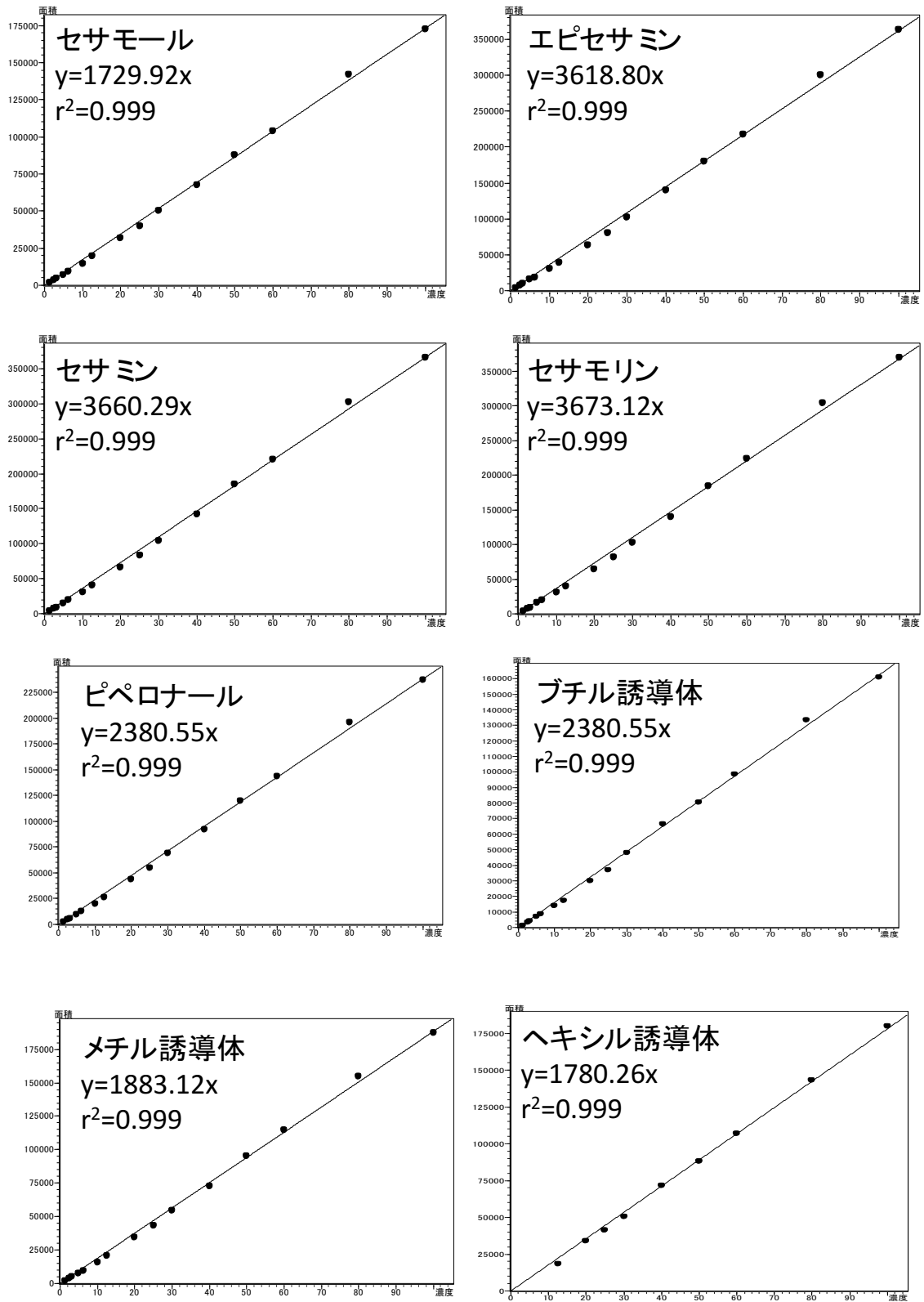


Fig. 8 絶対検量線 (0~100  $\mu$ M)

Table 2 各シングルリファレンスに対する RMS の算出

シングルリファレンス	分析対象物質	1.25-12.5 $\mu$ M	20-100 $\mu$ M	0-100 $\mu$ M	平均 $\pm$ SD
ピペロナル	セサモール	0.74	0.73	0.73	0.73 $\pm$ 0.01
	セサミン	1.55	1.54	1.54	1.54 $\pm$ 0.01
	エピセサミン	1.54	1.52	1.52	1.53 $\pm$ 0.01
	セサモリン	1.56	1.54	1.54	1.55 $\pm$ 0.01
メチル誘導体	セサモール	0.94	0.92	0.92	0.93 $\pm$ 0.01
	セサミン	1.97	1.94	1.94	1.95 $\pm$ 0.02
	エピセサミン	1.97	1.92	1.92	1.94 $\pm$ 0.03
	セサモリン	1.99	1.95	1.95	1.96 $\pm$ 0.02
ブチル誘導体	セサモール	1.06	1.07	1.07	1.07 $\pm$ 0.01
	セサミン	2.23	2.25	2.25	2.25 $\pm$ 0.01
	エピセサミン	2.23	2.23	2.23	2.23 $\pm$ 0.00
	セサモリン	2.25	2.26	2.26	2.26 $\pm$ 0.01
ヘキシル誘導体	セサモール	N.D.	0.47	N.D.	N.D.
	セサミン	N.D.	1.00	N.D.	N.D.
	エピセサミン	N.D.	0.99	N.D.	N.D.
	セサモリン	N.D.	1.00	N.D.	N.D.

Table 3 絶対検量線法とシングルリファレンス HPLC 定量法の定量値の比較

		絶対検量線法 定量値 mM ±SD	RMS法 定量値			
			ピペロナル mM ±SD	メチル誘導体 mM ±SD	ブチル誘導体 mM ±SD	ヘキシル誘導体 mM ±SD
ゴマ油	セサミン	15.7±0.12	15.9±0.21	16.9±0.28	14.7±0.16	30.7±0.67
	セサモリン	5.7±0.14	5.9±0.15	6.3±0.18	5.5±0.16	11.5±0.47
セサミンEX	セサミン	21.4±0.03	21.9±0.31	22.5±0.42	21.1±0.23	44.6±0.23
	エピセサミン	21.0±0.07	21.8±0.32	22.3±0.45	20.9±0.26	44.8±0.29
ゴマ油 不けん化物	セサミン	42.7±1.05	42.2±0.55	44.1±0.77	44.9±0.88	91.0±1.91
	セサモリン	17.6±0.15	17.7±0.29	18.5±0.25	18.9±0.22	38.5±1.47

Table 4 異なる分析条件でのゴマリグナン類の定量結果 (ピペロナル)

ピペロナル	SR添加濃度 $\mu\text{M} \pm \text{SD}$	ゴマ油		セサミンEX		ゴマ油不けん化物	
		セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\mu\text{M} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	エピセサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{M} \pm \text{SD}$
TSKge10DS-100V 東ソー社製)	25	17.5±0.1	6.2±0.8	24.4±0.1	24.4±0.3	42.1±1.2	17.7±0.3
	50	17.8±0.2	6.6±0.2	24.2±0.2	23.7±0.3	41.8±0.5	17.1±0.1
	100	17.0±0.2	6.0±0.3	22.4±0.5	21.9±0.5	42.4±0.4	17.7±0.1
Xbridge C18 Waters社製)	25	17.6±0.2	6.5±0.2	24.4±0.3	24.1±0.3	47.5±0.2	19.5±0.3
	50	17.8±0.2	6.4±0.2	23.7±0.2	23.3±0.3	44.9±0.5	18.7±0.5
	100	16.7±0.1	6.1±0.0	22.3±0.5	21.9±0.4	44.1±0.2	18.0±0.5
YMC-Pack Pro C18 RS YMC社製)	25	17.9±0.0	6.8±0.1	25.2±0.4	24.8±0.5	46.5±1.1	19.1±0.5
	50	18.0±0.1	6.7±0.0	24.6±0.1	24.4±0.2	44.0±1.0	18.6±0.6
	100	17.2±0.1	6.2±0.5	22.8±0.5	22.3±0.5	43.4±0.7	18.1±0.7
KNETEX Rhenomenex社製)	25	17.7±0.0	6.4±0.0	24.6±0.2	24.1±0.5	41.3±0.5	17.2±0.2
	50	17.8±0.1	6.6±0.1	24.2±0.1	23.7±0.2	41.8±0.5	17.4±0.2
	100	16.9±0.2	6.1±0.0	22.7±0.1	23.3±0.2	42.7±0.4	17.7±0.2
Inertstil0DS-2 GLサイエンス社製)	25	17.7±0.1	6.6±0.2	24.4±0.1	23.9±0.1	41.2±0.4	17.2±0.2
	50	18.2±0.1	6.6±0.1	24.2±0.4	23.8±0.3	42.2±0.5	17.7±0.2
	100	17.1±0.1	6.2±0.3	22.2±0.4	22.0±0.3	42.2±0.3	17.6±0.1
平均 $\text{mM} \pm \text{SD}$		17.5±0.43	6.4±0.24	23.8±0.96	23.4±0.94	43.3±1.86	18.0±0.7
RSD%		2.4	3.8	4.0	4.0	4.3	3.9

Table 5 異なる分析条件でのゴマリグナン類の定量結果 (メチル誘導体)

メチル誘導体	SR添加濃度 $\mu\text{M} \pm \text{SD}$	ゴマ油		セサミンEX		ゴマ油不けん化物	
		セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	エピセサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{mM} \pm \text{SD}$
TSKge10DS-100V 東ソー社製)	25	17.5±0.1	6.1±0.8	23.5±0.0	23.4±0.3	46.0±1.1	19.3±0.2
	50	18.1±0.3	6.6±0.3	23.1±0.3	22.8±0.4	41.4±0.8	17.7±0.1
	100	17.4±0.2	6.2±0.3	22.4±0.6	21.8±0.6	43.2±0.3	18.0±0.1
Xbridge C18 Waters社製)	25	17.7±0.3	6.6±0.2	23.7±0.2	23.4±0.2	43.7±0.5	17.9±0.3
	50	18.2±0.3	6.6±0.3	23.0±0.2	22.6±0.3	40.7±0.4	16.9±0.4
	100	17.1±0.2	6.3±0.0	22.4±0.6	22.0±0.5	43.0±0.1	17.5±0.4
YMC-Pack Pro C18 RS YMC社製)	25	17.8±0.0	6.7±0.1	24.3±0.6	23.9±0.8	44.7±0.3	18.3±0.2
	50	18.3±0.1	6.8±0.1	23.7±0.1	23.4±0.2	41.0±0.8	16.9±0.4
	100	17.5±0.1	6.3±0.5	22.8±0.5	22.3±0.6	42.7±0.8	17.8±0.7
KNETEX Rhenomenex社製)	25	17.7±0.1	6.4±0.0	22.8±0.5	23.4±0.4	45.6±0.1	19.0±0.2
	50	18.2±0.1	6.7±0.1	23.5±0.2	22.9±0.2	41.5±0.7	17.2±0.3
	100	17.3±0.2	6.3±0.1	22.8±0.2	22.4±0.3	44.0±0.4	18.2±0.2
Inertstil0DS-2 GLサイエンス社製)	25	17.8±0.1	6.6±0.2	23.4±0.2	22.9±0.1	44.6±0.7	18.5±0.3
	50	18.5±0.1	6.7±0.1	23.2±0.5	22.9±0.4	41.2±0.2	17.2±0.0
	100.0	17.4±0.1	6.3±0.3	22.1±0.5	21.7±0.4	43.2±0.6	18.0±0.2
平均 $\text{mM} \pm \text{SD}$		17.8±0.40	6.5±0.21	23.1±0.57	22.8±0.63	43.1±1.63	17.9±0.68
RSD%		2.2	3.2	2.5	2.8	3.8	3.8

Table 6 異なる分析条件でのゴマリグナン類の定量結果 (ブチル誘導体)

ブチル誘導体	SR添加濃度 $\mu\text{M} \pm \text{SD}$	ゴマ油		セサミンEX		ゴマ油不けん化物	
		セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	エピセサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{mM} \pm \text{SD}$
TSKgeI ODS-100V 東ソー社製)	25	17.0 $\pm$ 1.0	5.9 $\pm$ 0.5	22.0 $\pm$ 0.2	21.9 $\pm$ 0.2	43.5 $\pm$ 1.1	18.2 $\pm$ 0.5
	50	15.8 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.2	21.7 $\pm$ 0.2	21.3 $\pm$ 0.3	41.4 $\pm$ 0.8	16.7 $\pm$ 0.2
	100	16.2 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.2	22.5 $\pm$ 0.2	21.9 $\pm$ 0.2	41.8 $\pm$ 0.6	17.5 $\pm$ 0.2
Xbridge C18 Waters社製)	25	16.2 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.1	22.2 $\pm$ 0.3	21.9 $\pm$ 0.3	43.7 $\pm$ 0.2	17.9 $\pm$ 0.2
	50	16.0 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.2	21.3 $\pm$ 0.2	21.0 $\pm$ 0.3	41.4 $\pm$ 0.5	17.3 $\pm$ 0.5
	100	16.0 $\pm$ 0.0	5.9 $\pm$ 0.0	22.2 $\pm$ 0.1	21.8 $\pm$ 0.2	41.3 $\pm$ 0.1	16.8 $\pm$ 0.4
YMC-Pack Pro C18 RS YMC社製)	25	16.0 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.2	22.6 $\pm$ 0.3	22.2 $\pm$ 0.3	44.4 $\pm$ 0.2	18.2 $\pm$ 0.0
	50	16.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	22.0 $\pm$ 0.1	21.8 $\pm$ 0.2	41.4 $\pm$ 0.2	17.1 $\pm$ 0.2
	100	16.3 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.4	22.5 $\pm$ 0.1	22.0 $\pm$ 0.2	41.5 $\pm$ 0.7	17.3 $\pm$ 0.6
KINETEX Phenom enex社製)	25	16.4 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.0	22.9 $\pm$ 0.2	22.4 $\pm$ 0.2	44.6 $\pm$ 0.1	18.6 $\pm$ 0.2
	50	16.0 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.1	21.7 $\pm$ 0.1	21.3 $\pm$ 0.2	41.2 $\pm$ 0.3	17.1 $\pm$ 0.2
	100	16.2 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.0	22.7 $\pm$ 0.2	22.3 $\pm$ 0.1	41.5 $\pm$ 0.1	17.2 $\pm$ 0.1
Inertsil ODS-2 GLサイエンス社製)	25	16.3 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ 0.2	22.4 $\pm$ 0.4	22.0 $\pm$ 0.6	44.6 $\pm$ 0.2	18.6 $\pm$ 0.1
	50	16.3 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.2	22.2 $\pm$ 0.4	21.8 $\pm$ 0.3	40.6 $\pm$ 0.2	17.0 $\pm$ 0.1
	100	16.5 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.2	22.4 $\pm$ 0.1	22.2 $\pm$ 0.2	41.4 $\pm$ 0.2	17.3 $\pm$ 0.1
平均 $\text{mM} \pm \text{SD}$		16.1 $\pm$ 0.18	5.9 $\pm$ 0.09	22.2 $\pm$ 0.42	21.9 $\pm$ 0.39	42.2 $\pm$ 1.38	17.5 $\pm$ 0.60
RSD%		1.1	1.5	1.9	1.8	3.3	3.4

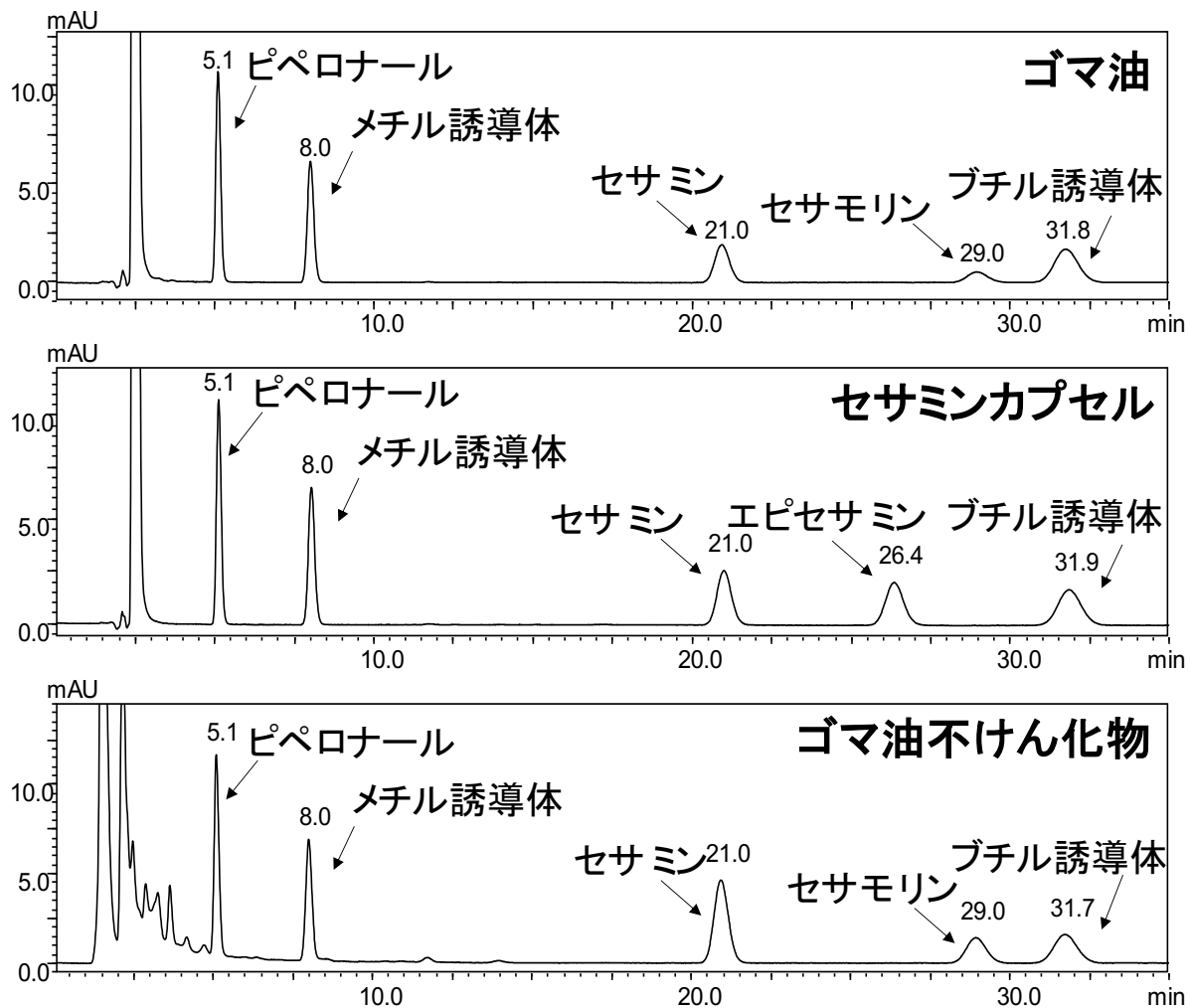


Fig. 9 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム  
(TSKgel ODS-100V, 東ソー社製)



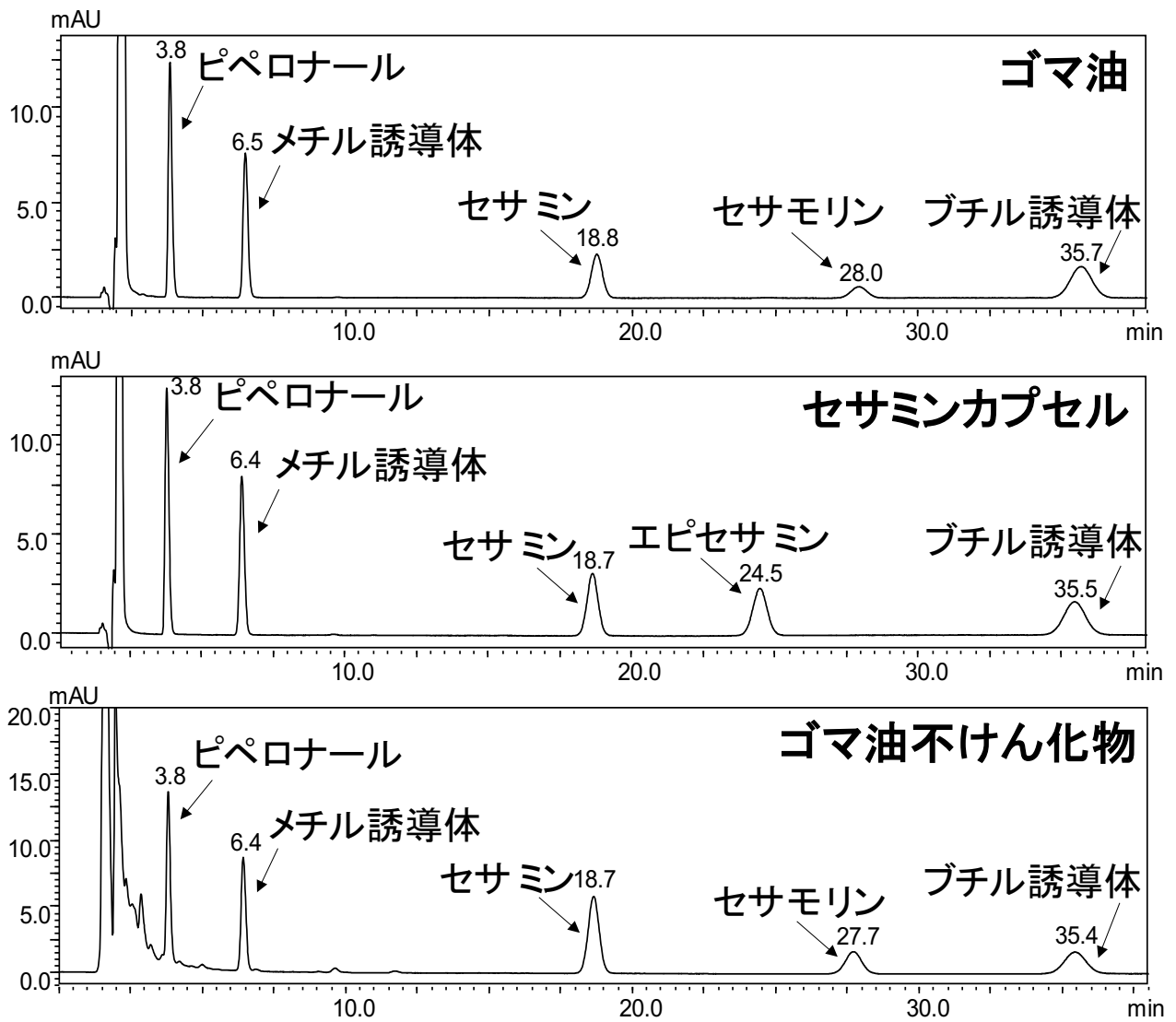


Fig. 10 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム  
(XBridge C18, Waters 社製)

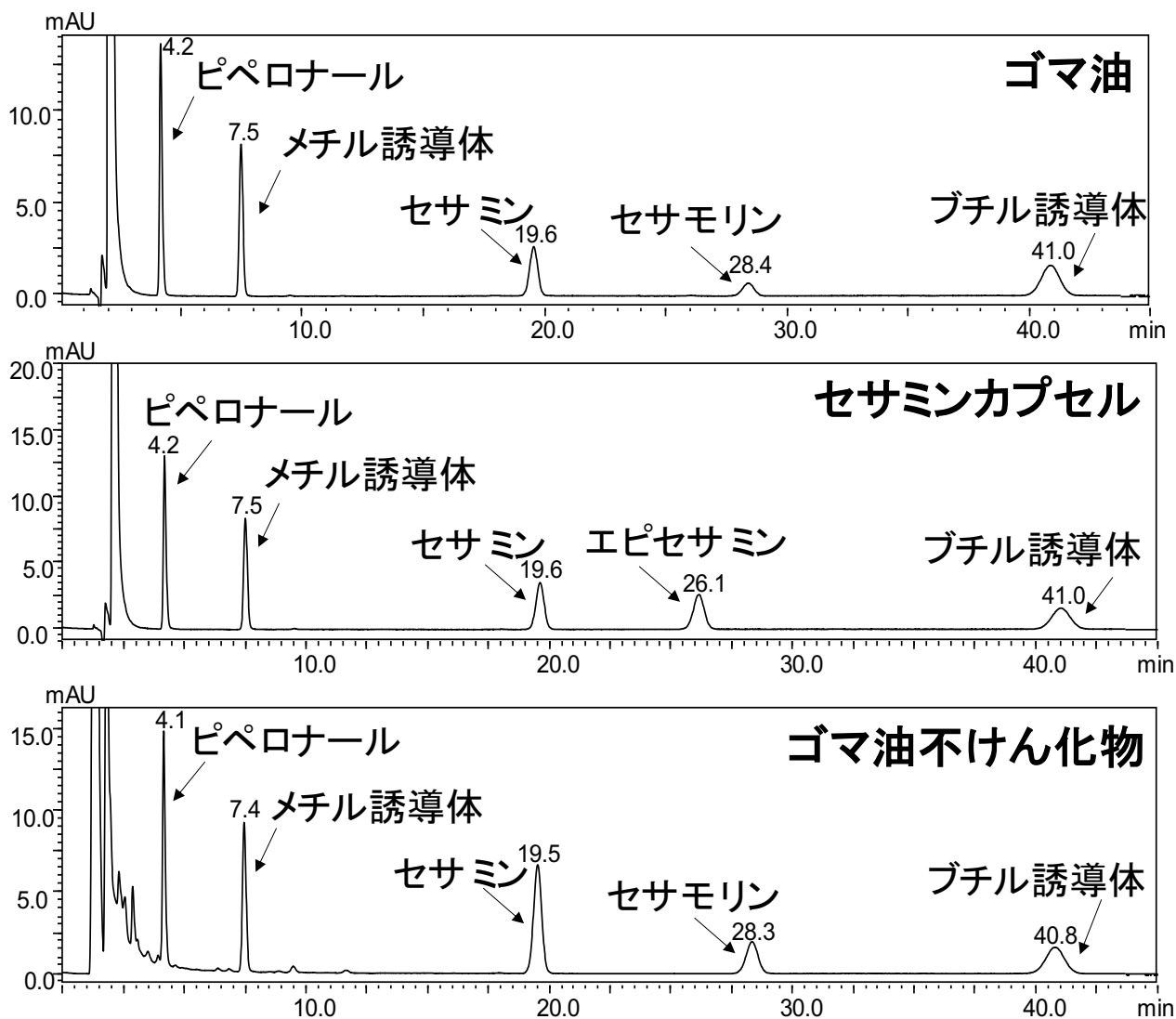


Fig. 11 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム  
(YMC-Pack Pro C18, YMC 社製)

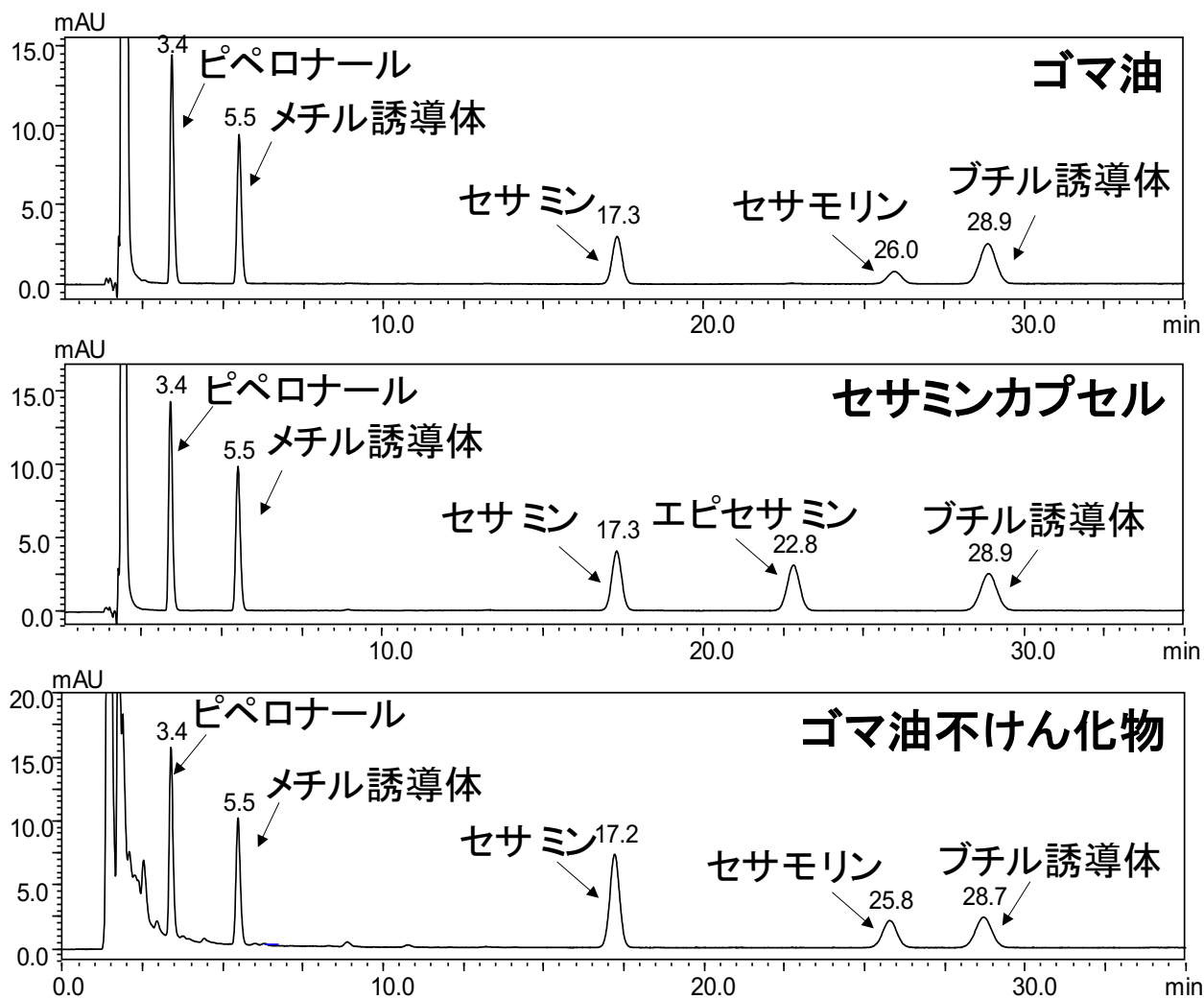


Fig. 12 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム  
(KINETEX, Phenomenex 社製)

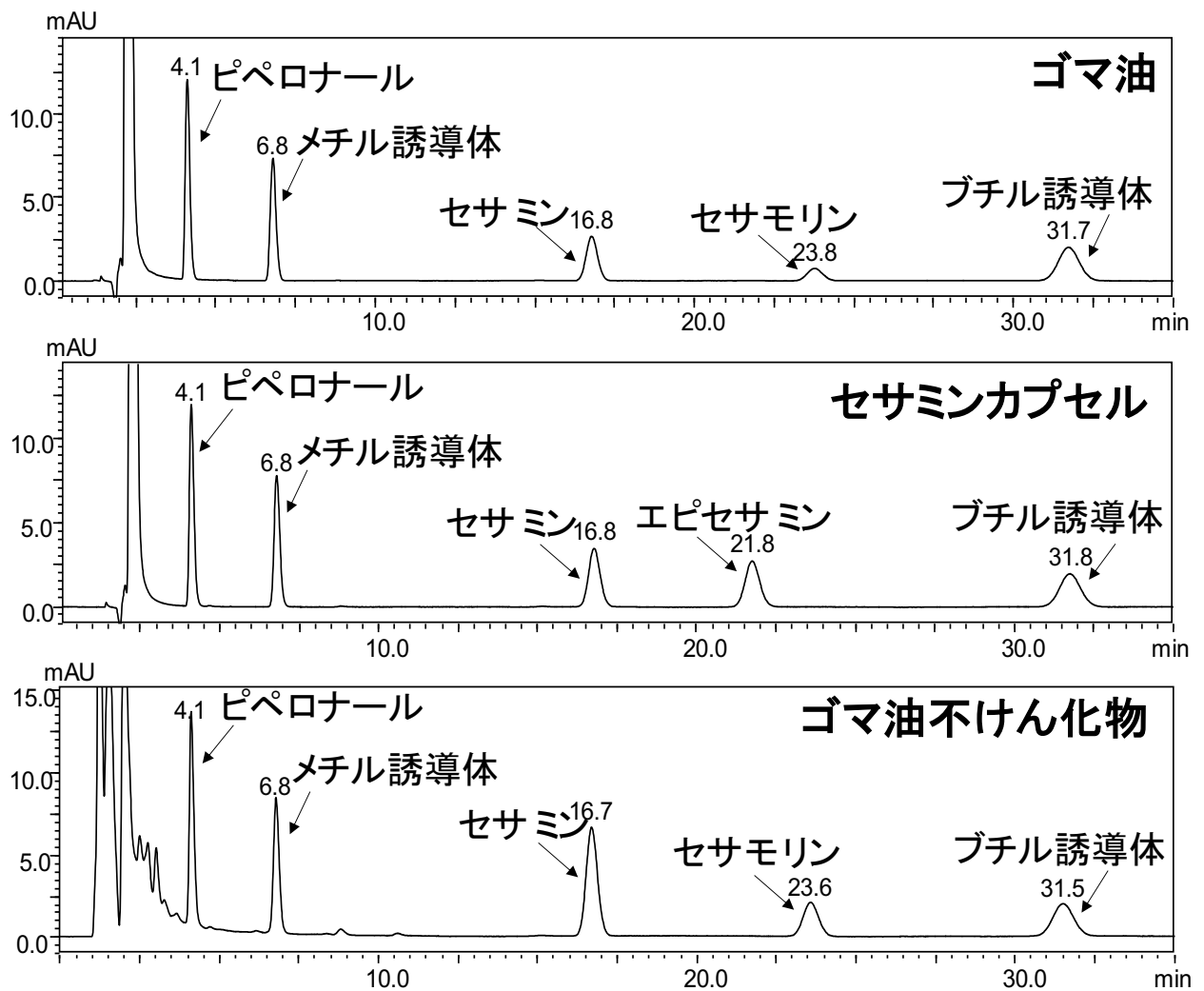


Fig. 13 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム  
(Inertsil ODS-2, GL サイエンス社製)

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の含有成分解析に関する研究

～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

**研究要旨** 第8版食品添加物公定書には、ベニコウジ色素（Monascus Color）が記載されている。また、第9版食品添加物公定書より、ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）が記載されている。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。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

ベニコウジ色素（Monascus Color）は、第8版食品添加物公定書に記載されており、主成分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<sup>1)</sup>。一方、ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）は、第9版食品添加物公定書より記載され、主成分はキサントモナシン類と示されている。いずれもベニコウジカビ（*Monascus purpureus*）が生成している色素であるため、培地条件や抽出方法により異なる成分が含有する可能性がある<sup>2)</sup>。それゆえに、本研究では、国内流通品のベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の成分規格を検討することとした。

以前では、ベニコウジ色素の赤色の主成分は、HPLCによる評価は困難であった。そのため、高速向流クロマトグラフィー(HSCCC)などを利用した主成分の同定を試み、品質評価への展開を実施した。HSCCCは、液-液抽出に基づく液体

クロマトグラフィーであるため、サンプルの不可逆的吸着がなく、簡便かつ効率的な分離分析できる方法である<sup>3-4)</sup>。ゆえに、ベニコウジ色素をHSCCCにより成分評価を行い、規格の検討をすることとした。一方で、ベニコウジ黄色素の主成分は、HSCCCによりキサントモナシンAおよびキサントモナシンBが主成分と想定されたが、いずれの標準品が入手困難であった。そこで、簡便かつ汎用性の高い規格基準を設定するため、分析対象物質の標準品に頼らない、相対モル感度係数(Relative Molar Sensitivity, RMS)によるシングルリファレンス HPLC 定量法を構築・検討することとした<sup>5)</sup>。

## B. 研究方法

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、三栄源エフエフアイ社製などの国内で入手可能なものを用いた。なお、キサントモナシンAおよびBのシングルリファレンスとして、和光純薬社製のカルバゾクロムスルホン酸ナトリ

ウム三水和物を用いた。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

LC 装置：島津製作所製 LC-20AD/SIL-20AC/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS 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

NMR 装置：日本電子社製 JNM ECA MHz spectrum

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°C

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°C

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。なお、分析パターンを検討する際は、コイル容量は 75 mL、流速は 1.0 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、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液(1/5/1/5, 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 1.5 mL/min で送液した。

単離したキサントモナシン A および B の定量  
NMR：単離したキサントモナシン A および B を 0.2 mg/mL 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>を含む重メタノール 1.0 mL で溶解し、そのうち 0.8 mL を NMR 菅チューブに移した。

データ数：60,000

パルス角：90°

遅延時間：60 秒

繰り返し回数：8~16 回

観測幅：-5~15 ppm

RMS の算出：キサントモナシン A および B とシングルリファレンスについて、絶対検量線を作成した。シングルリファレンス (カルバゾクロムスルホン酸ナトリウム三水和物の分子量からカルバゾクロムの重量を算出してフリー体とした) に対するキサントモナシン A および B の検量線の傾きの比より、RMS を算出した。

シングルリファレンス HPLC 定量法の妥当性評価：求めた RMS を用いて、絶対検量線法との定量値を比較した。なお、絶対検量線法で用いた標準品には、HSCCC にて単離精製したキサントモナシン A および B を用いた。また、異なる分析条件 (カラムや移動相) でのシングルリファレンス HPLC 定量法での定量性を検討した。用いた

カラムは TSKgel ODS-100V (東ソー社製), XBridge C18 (Waters 社製), Inertsil ODS-2 (GLサイエンス社製), YMC-Pack Pro C18 (YMC 社製) および KINETEX (Phenpmex 社製) である。さらに, 添加するシングルリファレンスを 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  の 3 種類の異なる濃度において定量値の再現性を確認した。

### C. 研究結果

本研究では, 国内で流通している 6 種類のベニコウジ色素をサンプルとして用いた。それらの HPLC クロマトグラムを Fig. 1 に示す。その結果, A 社のサンプルでは明確な 4 つのピークが確認されたが, 他社のサンプルでは全く異なるクロマトグラムのパターンを示し, 明確な判別ができなかった。そこで, ベニコウジ色素の基礎的な HSCCC 検討には, A 社のサンプルを用いた。

A 社のサンプルを用いて, MS 分析により分子イオンピークを検出した。そのときのピーク a から d の MS スペクトルを Fig. 2 に示した。分析結果より, ピーク a と b, ピーク c と d はそれぞれ分子イオンピークが一致したため, 構造異性体の可能性が示唆された。

次に, HPLC により, A 社のピーク a から d の HSCCC で用いる最適な二層溶媒系を検討した。その二層溶媒系の分配係数および分離係数の結果を Table 1 に示した。その結果, ベニコウジ色素のピーク a から d の分配係数がそれぞれ 0.29, 0.26, 0.77, 0.72, 分離係数が A/C 2.66, B/D が 2.77 であるヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液 (4/5/4/5, v/v/v/v) を採用することとした。

本条件を用いて, HSCCC による単離精製を実施した。そのときに得られた HSCCC クロマトグラムを Fig. 3 に示した。HSCCC 分析結果により, 固定相の保持率は 70%, 分析時間は約 150 分であった。HSCCC クロマトグラムに置いて, 3 つのピークが確認されたため, Fraction I から III に分取した。また, メタノール置換によって, 全て

の色彩成分が回収できた (Fig. 4)。

HSCCC で分取した Fraction I から III をそれぞれ HPLC で分析した結果を Fig. 5 に示した。Fraction I では, 明確なピークが確認されなかったが, Fraction II および III ではそれぞれ 2 本のピークが確認された。しかし, HSCCC の結果より, Fraction I が最も赤色の吸収が強い 500 nm でのピーク強度が強く, 赤色成分を多く含有していたため, Fraction I が主成分であると判断した。

HSCCC による国内流通品ベニコウジ色素の分析を検討した。HPLC で分析が困難であった 6 種類のベニコウジ色素を用いて, HSCCC での分離パターンを検討した。今回は, 容易に高極性物質を分配可能な二相溶媒系であるブタノール: 酢酸エチル: 水溶液 (4/1/5, v/v/v) に変更し, HSCCC による分析を行うこととした。その HSCCC 分析結果を Fig. 6 および 7 に示した。保持率は 40% であり, 分析時間は 50 分であった。その結果より, サンプル A から F は分離パターンがわずかに異なり, 各サンプルによって含有する成分は異なった。

ベニコウジ黄色素において, 三栄源 FFI (株) のサンプルを用いた。HPLC によりキサントモナシン A および B の最適な二層溶媒系の分配係数と分離係数を検討した。その結果を Table 2 に示す。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 (1/5/1/5, v/v/v/v) を採用した。

その条件により, HSCCC による単離を実施した。なお, 固定相の保持率は 76% であり, 分析時間は 450 分であった。HSCCC のクロマトグラム (Fig. 8) より明確な 2 つのピーク (Fraction A および B) が検出され, 単離精製することができた。さらに, 単離精製した化合物を MS スペクトルや MS/MS スペクトルによりキサントモナシン類であると同定された (Fig. 10)。いずれも定量  $^1\text{H-NMR}$  (Fig. 11) により, NMR 菅チューブにキサントモナシン A は 2.94  $\text{mg}\pm 0.018$ , キサントモナシン B は 1.40  $\text{mg}\pm 0.040$  であった。

定量 NMR で得られた定量値に基づき, キサン

トモナシン A および B, シングルリファレンス (カルバゾクロム:カルバゾクロムスルホン酸ナトリウム三水和物の分子量からカルバゾクロムの重量を算出してフリー体とした)について絶対検量線を作成し, RMS を求め, Fig. 12 および Table 3 に示した. その結果より, キサントモナシン A の RMS は  $8.75 \pm 0.06$ , キサントモナシン B の RMS は  $14.8 \pm 0.25$  であり, その値は異なる濃度幅において再現性の高い値であった.

4 種の国内流通しているベニコウジ黄色素製剤を用いて, 従来の絶対検量線法とシングルリファレンス HPLC 定量法にてキサントモナシン類の定量値を比較した. その結果を Fig. 14 と Table 4 に示した. 新たに開発した本定量法により, 絶対検量線法と同等の定量値が得られ, 正確な定量性が確認された.

また, 異なる HPLC の分析条件において, シングルリファレンス HPLC 定量法での定量値を検討した. 本研究では, 5 種のカラムとその移動相条件, 添加するシングルリファレンス濃度を変更し, その結果を Fig. 12 と Table 5 に示した. それぞれのカラムに最適な移動相条件を決定し, シングルリファレンス定量法で得られた定量値はキサントモナシン A では  $9.2 \mu\text{mol/g} \pm 0.23$  (RSD 2.5%), キサントモナシン B では  $3.2 \mu\text{mol/g} \pm 0.10$  (RSD 3.0%) であった.

#### D. 考察

本研究では, ベニコウジカビが生成するベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の新たな規格試験の検討を実施した. 以前では, ベニコウジ色素は HPLC での分析は困難であった. ゆえに, 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/v) の二相溶媒系を用いて HSCCC にて単離精製をした結果, 3 つの Fraction に分取できた. HPLC 分析を行った結果, Fraction I は明確なピークが得られなかったが, Fraction II ~ III において, ピークが観察された. 以上のことから, HSCCC によりベニコウジ色素の主成分を単離精製が達成することができたといえる. また, 高極性物質を容易に分配させる

ことができると考えられる二相溶媒系であるブタノール:酢酸エチル:水 (4/1/5, v/v/v) に変更し, HSCCC での分析を行うこととした結果, 国内流通品のベニコウジ色素にて HSCCC 分離パターンがわずかに異なった. 理由として, 各サンプルの培養条件が異なり, 含有する成分が異なることが挙げられる.

ベニコウジ黄色素の主成分であるキサントモナシン A および B の標準品が入手不可能であるため, HSCCC にて単離精製を実施した. 二相溶媒系の検討をした結果, ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液 (1/5/1/5, v/v/v/v) が最適であると判断した. その条件により主に 2 つの Fraction を得ることができ, LC 分析の結果, Fraction A はキサントモナシン A, Fraction B はキサントモナシン B であると同定できた. それぞれ単離したキサントモナシン類を用いて, 定量 NMR にて絶対量を求め, RMS を算出した. その結果, キサントモナシン A の RMS は 8.75, キサントモナシン B の RMS は 14.8 であった. これらの RMS を用いて, ベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量した結果, 従来の絶対検量線法から得られる定量値と同等の値を示し, さらに HPLC の分析条件 (カラムや移動相) を変更しても高い再現性が確認された.

#### 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: 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, RMS によるシングルリファレンス



HPLC 定量法を構築した。その結果、標準品に頼らず、簡便で安価なキサントモナシン類の定量が可能となった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし

### 2. 学会発表

- 1) 高橋未来, 西崎雄三, 多田敦子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 穂山浩, 佐藤恭子, 井之上浩一: 相対モル感度係数を利用したベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量法の確立 日本食品化学学会第 23 回総会・学術大会 (三重県伊勢市) 6 月 (2017 年)
- 2) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: HSCCC/qNMR-HPLC による相対モル感度係数を利用した天然色素中のキサントモナシンの定量法の構築 第 28 回クロマトグラフィー科学会議 (京都) 11 月 (2017 年度)
- 3) Miki Takahashi, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato, Koichi Inoue : Development of Quantitative Analysis of Main Components in Natural Products by Liquid Chromatography with Molar Absorption Coefficient Ratio and High-speed Countercurrent Chromatography PITTCON 2018 (Orlando) 2 月 (2018 年)
- 4) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤直子, 石附京子, 中島馨, 佐藤恭子, 井之上浩一: 既存添加物の規格設定を目指したシングルリファレンス HPLC 定量法の開発 日本食品衛生学会 近畿地区勉強会 (大阪) 3 月 (2018 年)

## 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) 日本食品添加物協会; 第 8 版 食品添加物公定書 2007 年 8 月 31 日発行
- 2) Jung H, Kim C, Kim K, Shin CS.; *J. Agric. Food Chem.* 51, 1302-1306. (2003)
- 3) Inoue K, Ito Y, Hattori Y, Tsutsumiuchi K, Ito S, Hino T, Oka H; *Jpn. J. Food Chem. Safety* 17, 185-191. (2010)
- 4) Yamaguchi K, Kurata S; *Bunseki Kagaku* 54, 1091-1100. (2005).
- 5) Nishizaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Sugimoto N, Numata M, Ihara T; *Anal. Chem.* 89, 6963-6968 (2017)

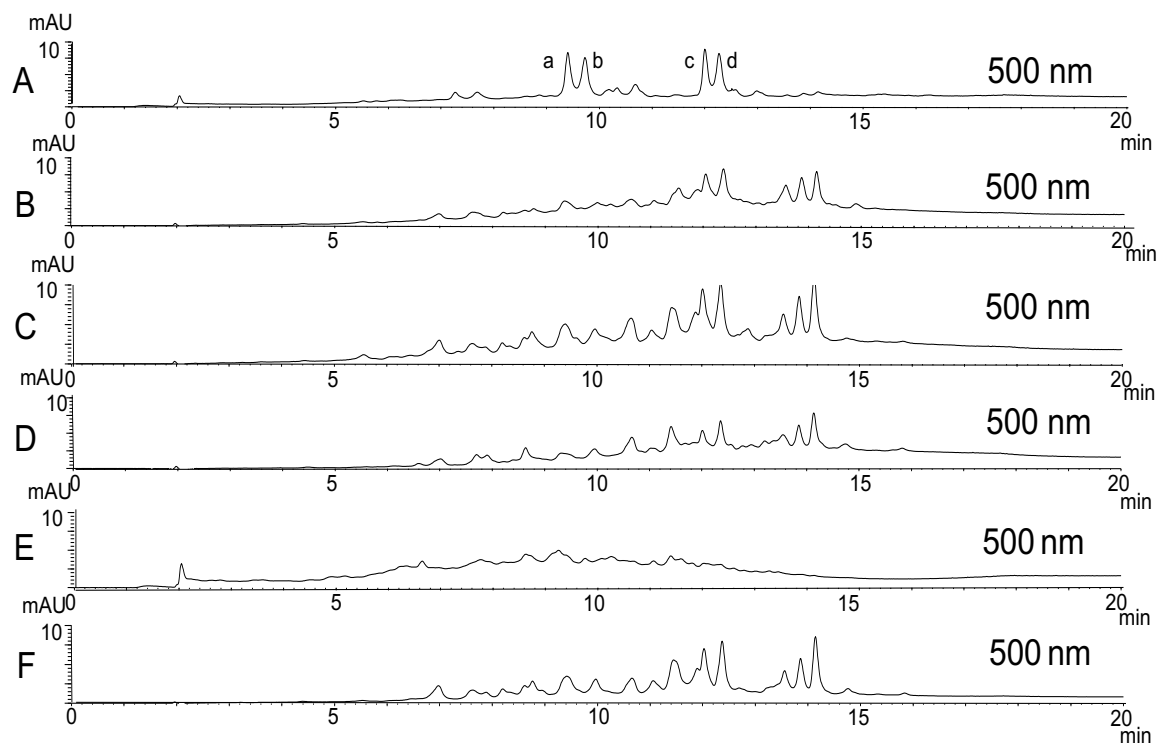


Fig. 1 国内流通品のベニコウジ色素における HPLC クロマトグラム

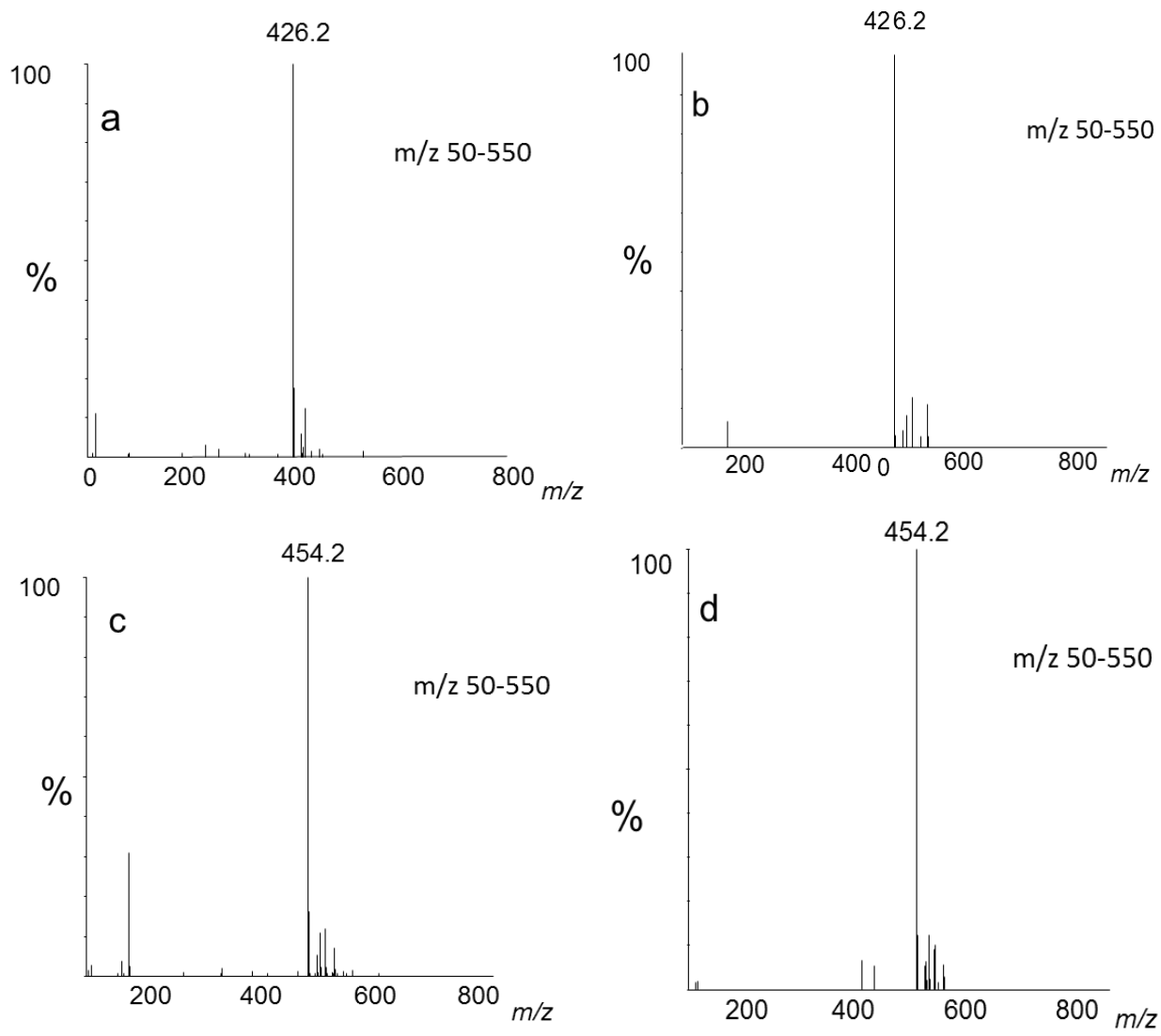


Fig. 2 A社のベニコウジ色素中のピークA~DのMSスペクトル

Table 1 ピーク A~D における二相溶媒系の分配係数 (K) および分離係数 ( $\alpha$ )

Two-solvent system						K $\pm$ SD				$\alpha$	
ヘキサン	酢酸エチル	ブタノール	メタノール	水	0.1%ギ酸水溶液	a	b	c	d	a/c	b/d
0	5	0	0	5	0	0.21 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	1.56 $\pm$ 0.27	1.38 $\pm$ 0.22	7.43	7.67
0	4	1	0	5	0	0.36 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01	2.59 $\pm$ 0.08	2.16 $\pm$ 0.04	7.19	6.75
0	3	2	0	5	0	0.80 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.01	4.64 $\pm$ 0.12	3.98 $\pm$ 0.11	5.80	4.80
5	5	0	5	0	5	0.06 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.04	3.17	3.00
4	5	0	4	0	5	0.29 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.10	0.72 $\pm$ 0.09	2.66	2.77
3.5	5	0	3.5	0	5	0.44 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.01	1.41 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.06	2.59	3.30
3	5	0	3	0	5	1.11 $\pm$ 0.04	1.07 $\pm$ 0.07	4.34 $\pm$ 0.25	4.27 $\pm$ 0.21	3.91	3.99

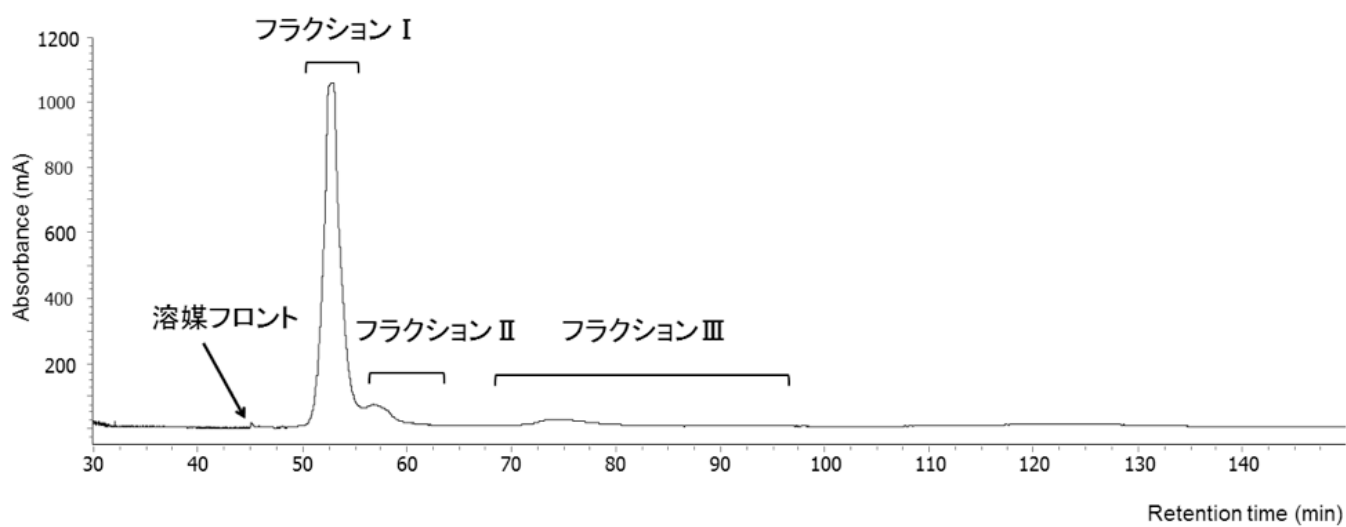
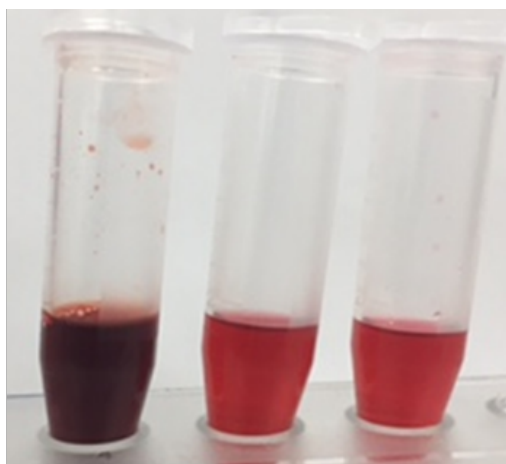


Fig. 3 ベニコウジ色素の HSCCC クロマトグラム (検出波長 : 500 nm)



フラクシオン I フラクシオン II フラクシオン III

Fig. 4 回収した各フラクシヨンの色彩成分

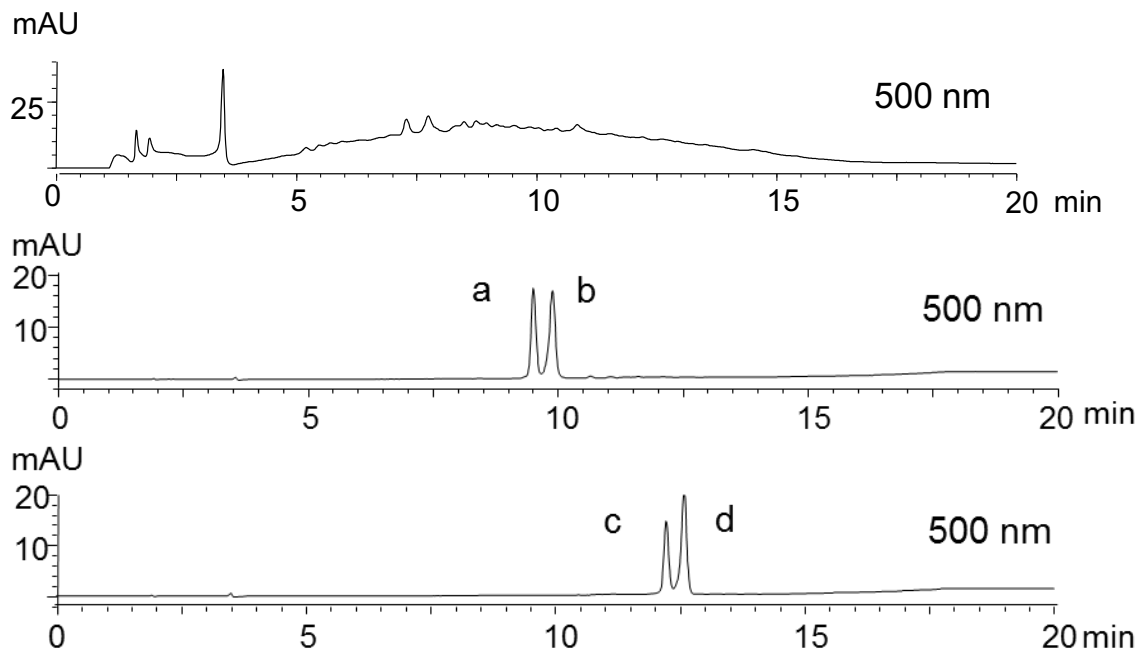


Fig. 5 分取した各フラクション I ~ III の HPLC クロマトグラム

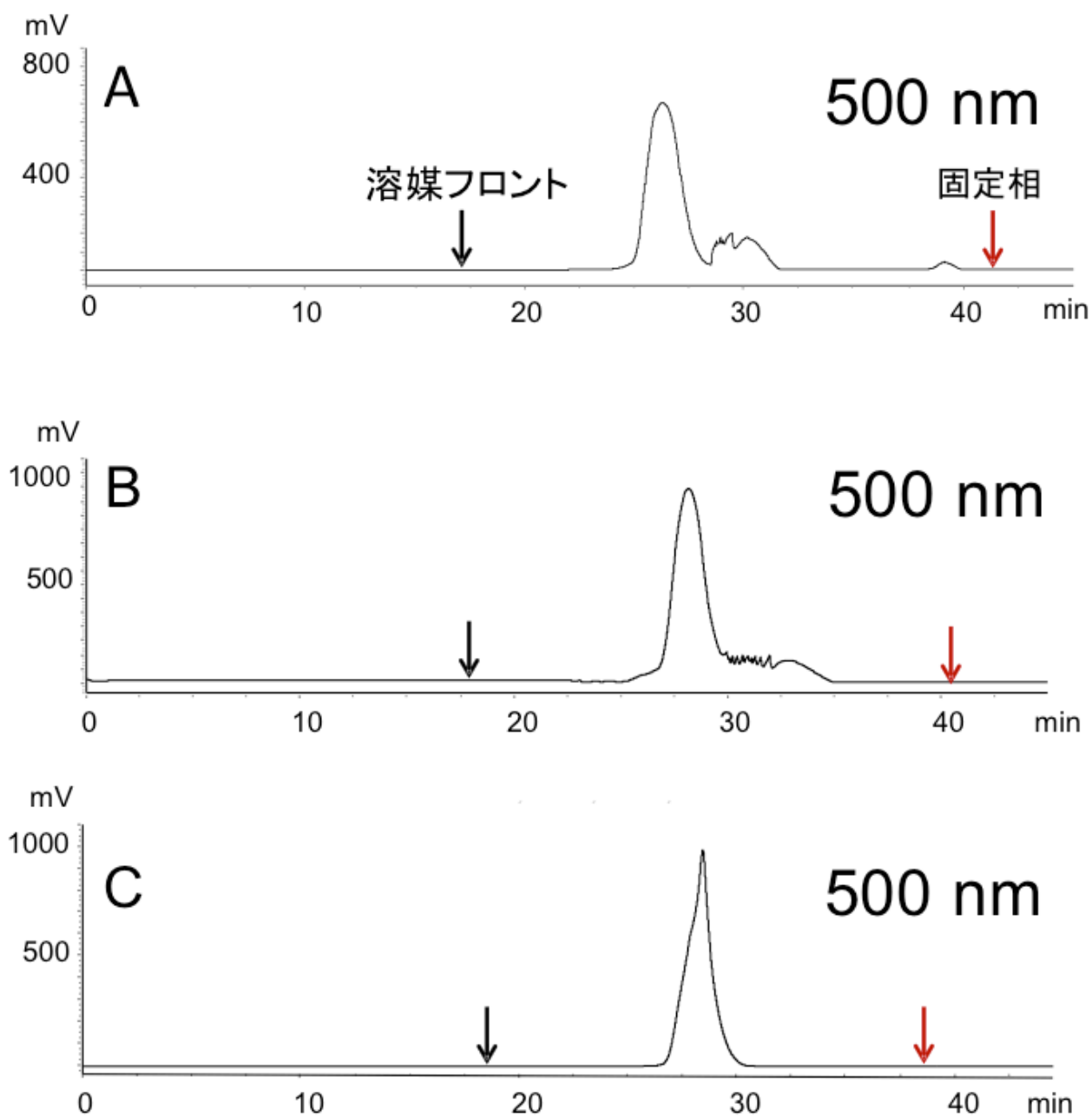


Fig. 6 A~C 社におけるベニコウジ色素の HSCCC クロマトグラム

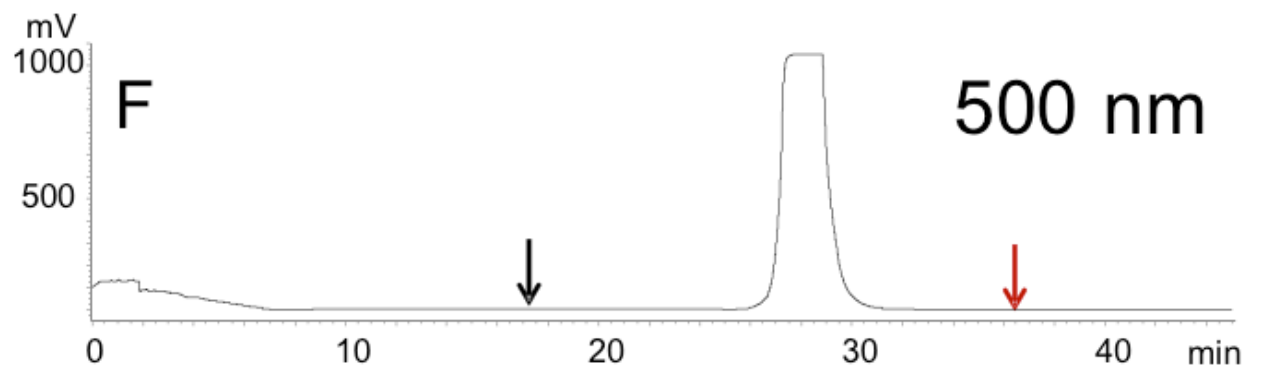
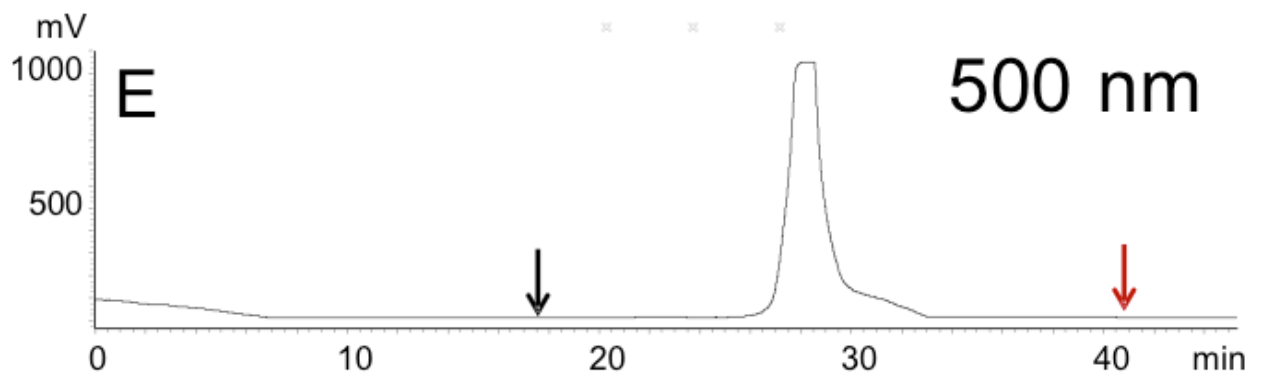
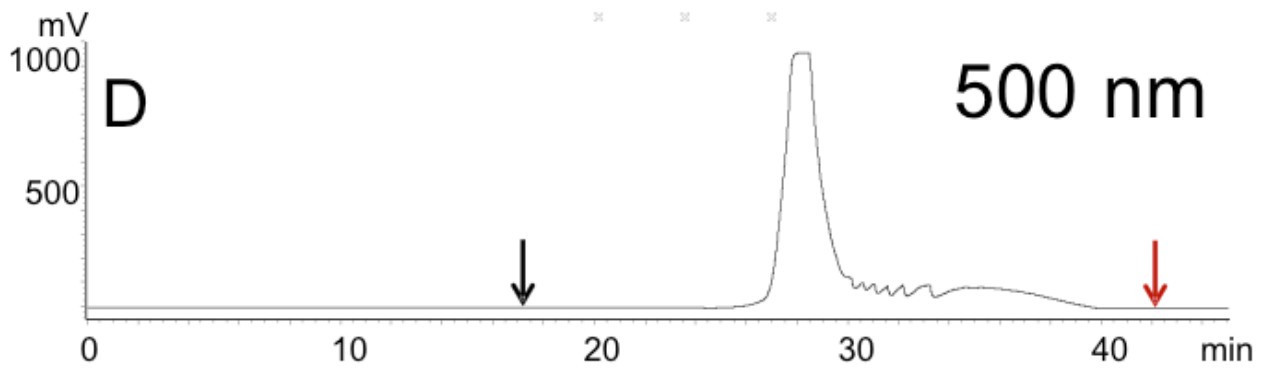


Fig. 7 D~F 社におけるベニコウジ色素のHSCCCクロマトグラム



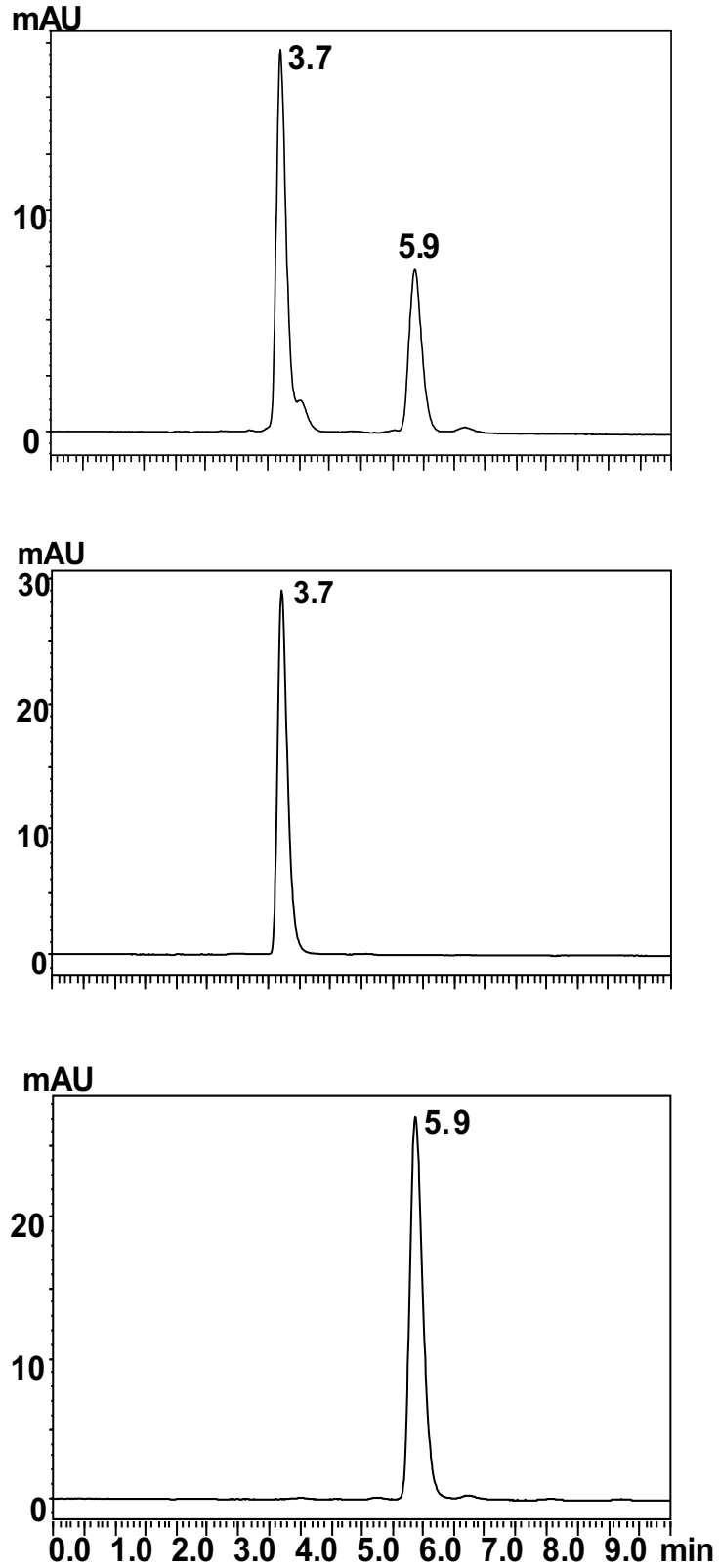


Fig. 8 HPLC クロマトグラム (検出波長 : 460 nm)  
上 : ベニコウジ黄色素, 中 : キサントモナシン A, 下 : キサントモナシン B

Table 2 二相溶媒系におけるキサントモナシン A および B の分配係数および分離係数

Two-phase solvent system Hexane/ethyl acetate /methanol/0.1% FA in water	Partition coefficient (K) $\pm$ SD (n=3)		Separation factor ( $\alpha$ ) $\pm$ SD (n=3)
	XA	XB	
5/5/5/5	NC	NC	NC
4/5/4/5	NC	0.06 $\pm$ 0.01	NC
3/5/3/5	0.01 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	3.52 $\pm$ 0.05
2/5/2/5	0.09 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.02	4.78 $\pm$ 0.08
1/5/1/5	0.33 $\pm$ 0.03	2.02 $\pm$ 0.14	6.05 $\pm$ 0.14
0/5/0/5	0.72 $\pm$ 0.09	9.55 $\pm$ 0.70	6.33 $\pm$ 0.20

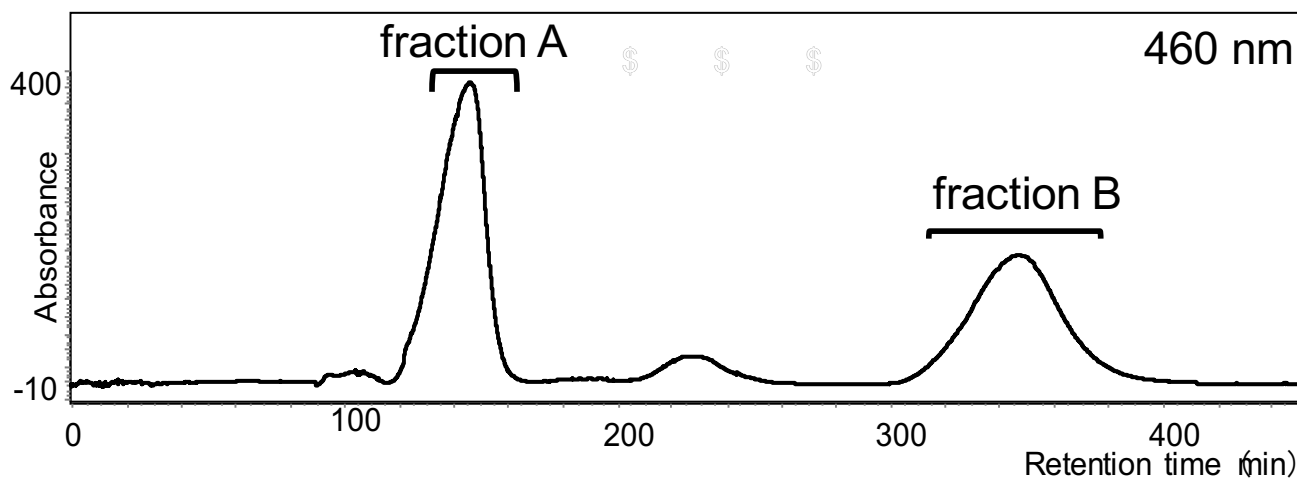


Fig. 9 ベニコウジ黄色素の HSCCC クロマトグラム (検出波長 : 460 nm)

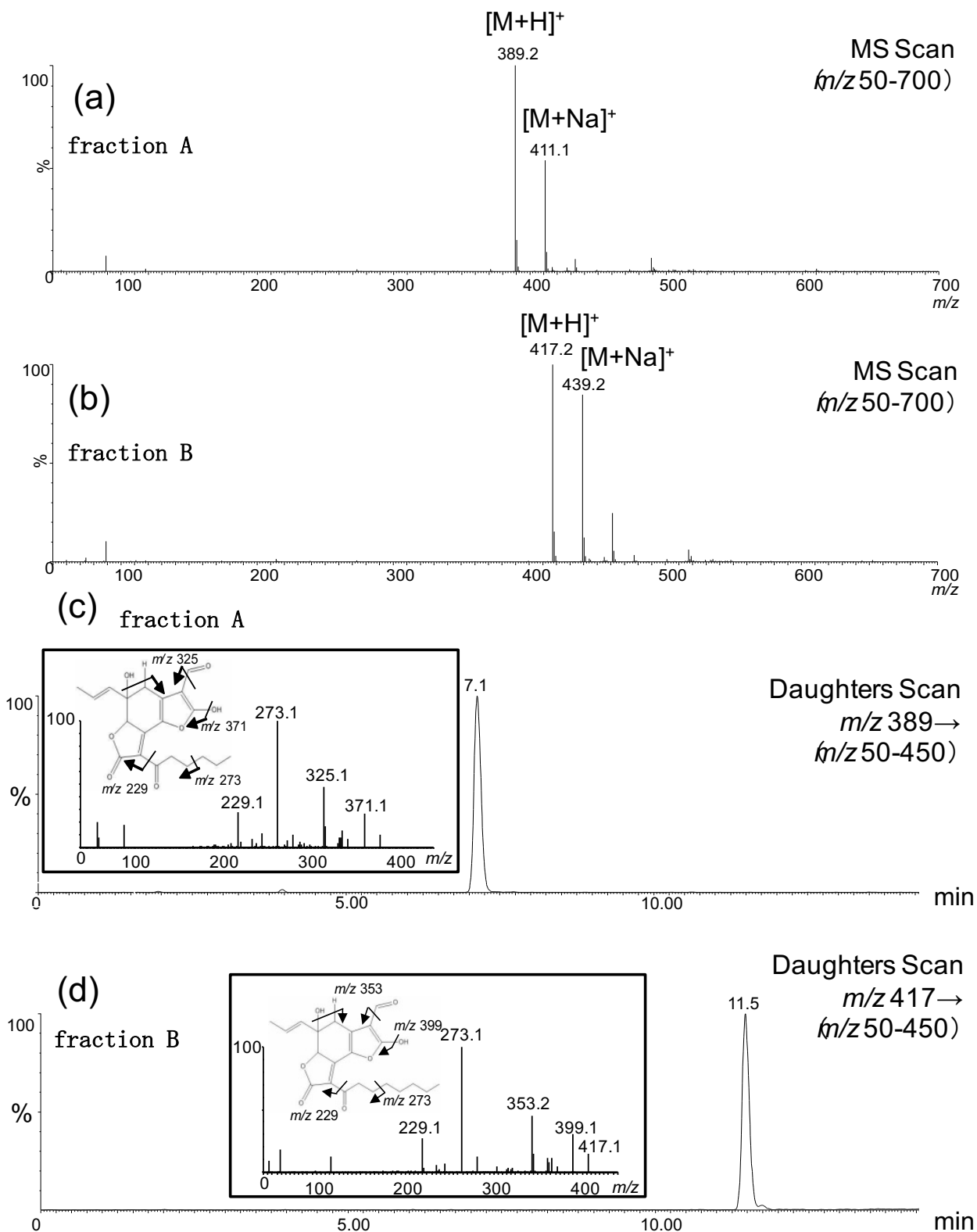


Fig. 10 単離精製した化合物の MS スペクトルおよび MS/MS スペクトル

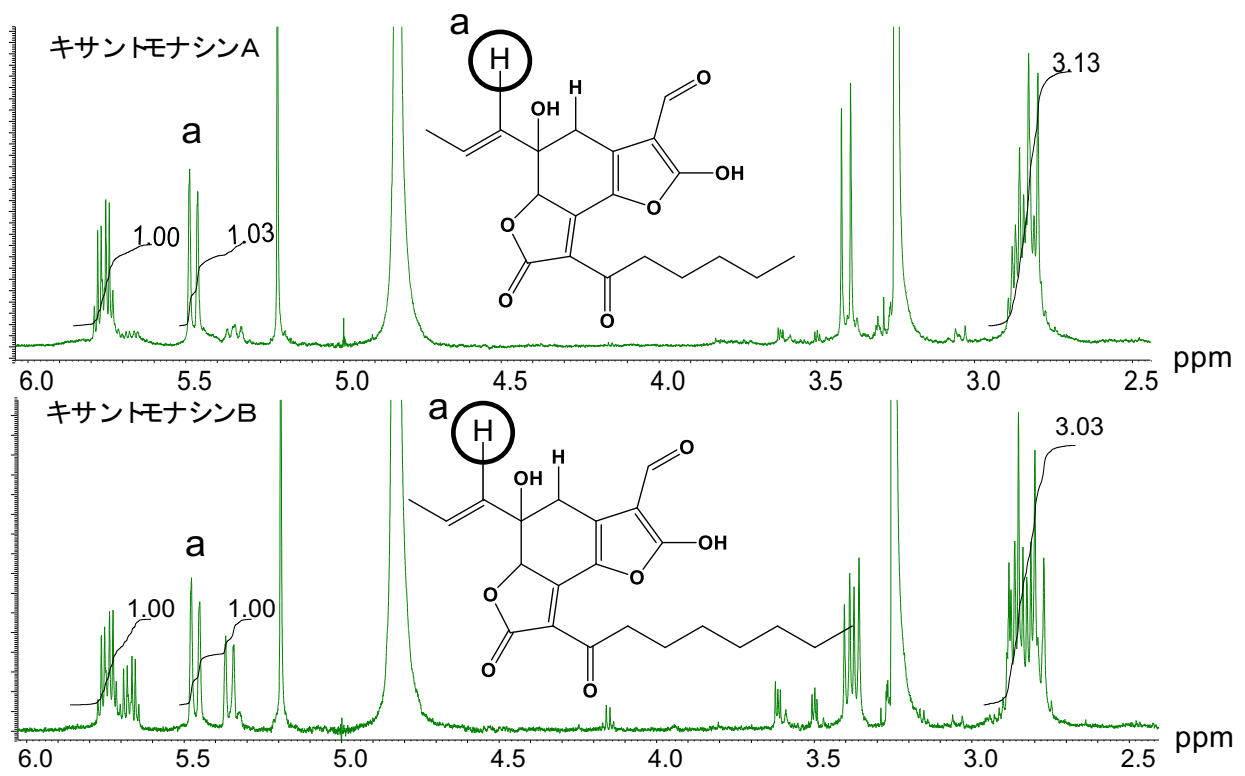


Fig. 11 単離したキサントモナシン A および B の定量 NMR

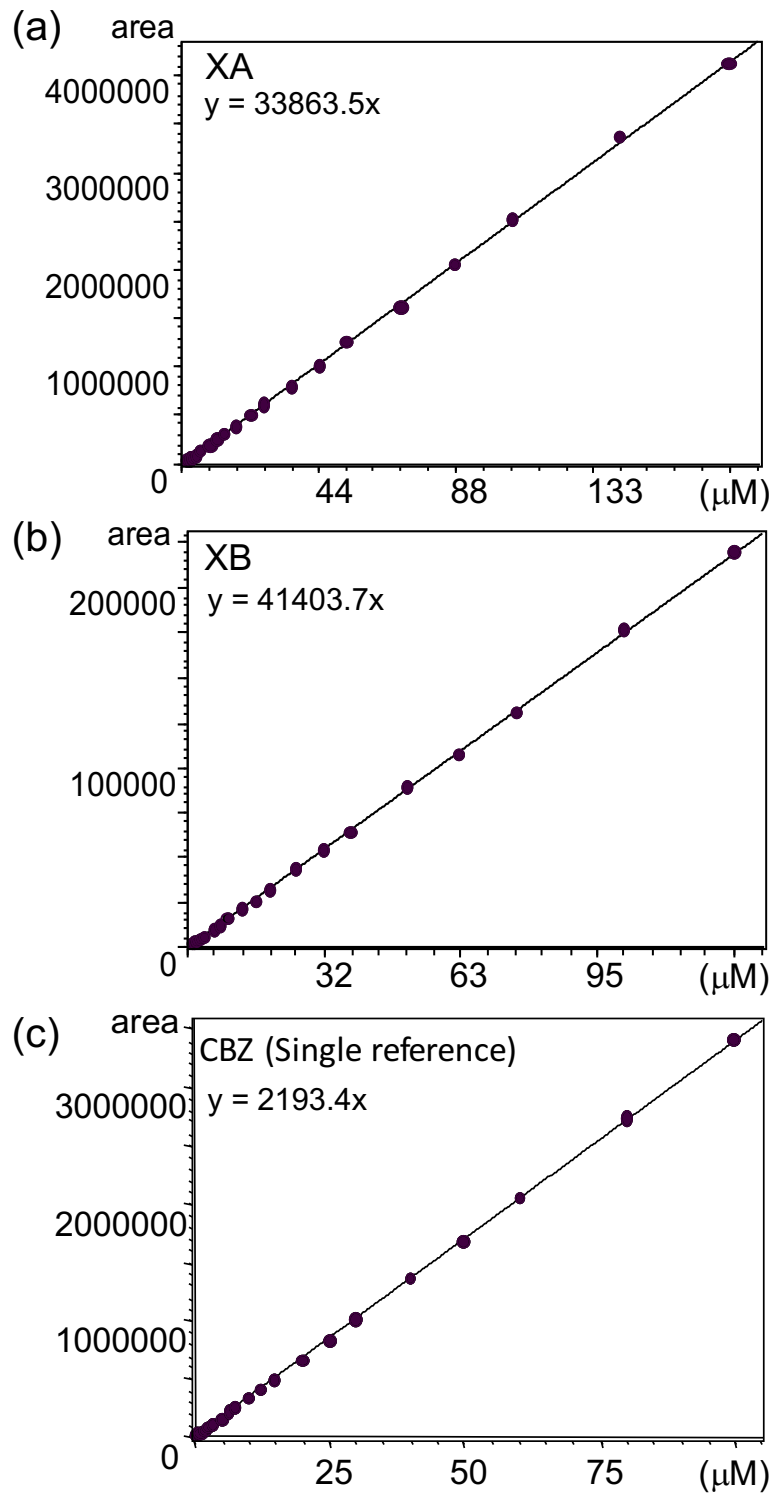


Fig. 12 絶対検量線

(a) キサントモナシン A, (b) キサントモナシン B, (c) カルバゾクロム (カルバゾクロムスルホン酸ナトリウム三水和物の分子量からカルバゾクロムの重量を算出してフリー体とした)

Table 3 検量線の異なる濃度幅における RMS の算出

	Range( $\mu$ M)	相関係数	RMS
XA	0 - 11.1	0.999	8.85
	13.3 - 44.2	0.999	8.68
	53.0 - 177	0.999	8.73
	0 - 177	0.999	8.73
	平均 $\pm$ SD		8.75 $\pm$ 0.06
XB	0 - 7.94	0.999	15.0
	9.45 - 31.5	0.998	14.7
	37.8 - 126	0.999	14.4
	0 - 126	0.999	15.0
	平均 $\pm$ SD		14.8 $\pm$ 0.25

Table 4 絶対検量線法とシングルリファレンス HPLC 定量法との定量値の比較

ベニコウジ黄色素 サンプル	シングルリファレンスHPLC定量法		絶対検量線法	
	XA 定量値 ( $\mu\text{mol/g}$ ) $\pm$ SD	XB 定量値 ( $\mu\text{mol/g}$ ) $\pm$ SD	XA 定量値 ( $\mu\text{mol/g}$ ) $\pm$ SD	XB 定量値 ( $\mu\text{mol/g}$ ) $\pm$ SD
1	9.7 $\pm$ 0.02	3.4 $\pm$ 0.01	9.7 $\pm$ 0.04	3.3 $\pm$ 0.02
2	19.9 $\pm$ 0.10	6.9 $\pm$ 0.03	20.4 $\pm$ 0.03	6.9 $\pm$ 0.01
3	9.5 $\pm$ 0.05	3.1 $\pm$ 0.04	9.9 $\pm$ 0.02	3.2 $\pm$ 0.01
4	10.0 $\pm$ 0.09	3.3 $\pm$ 0.04	10.3 $\pm$ 0.08	3.3 $\pm$ 0.01

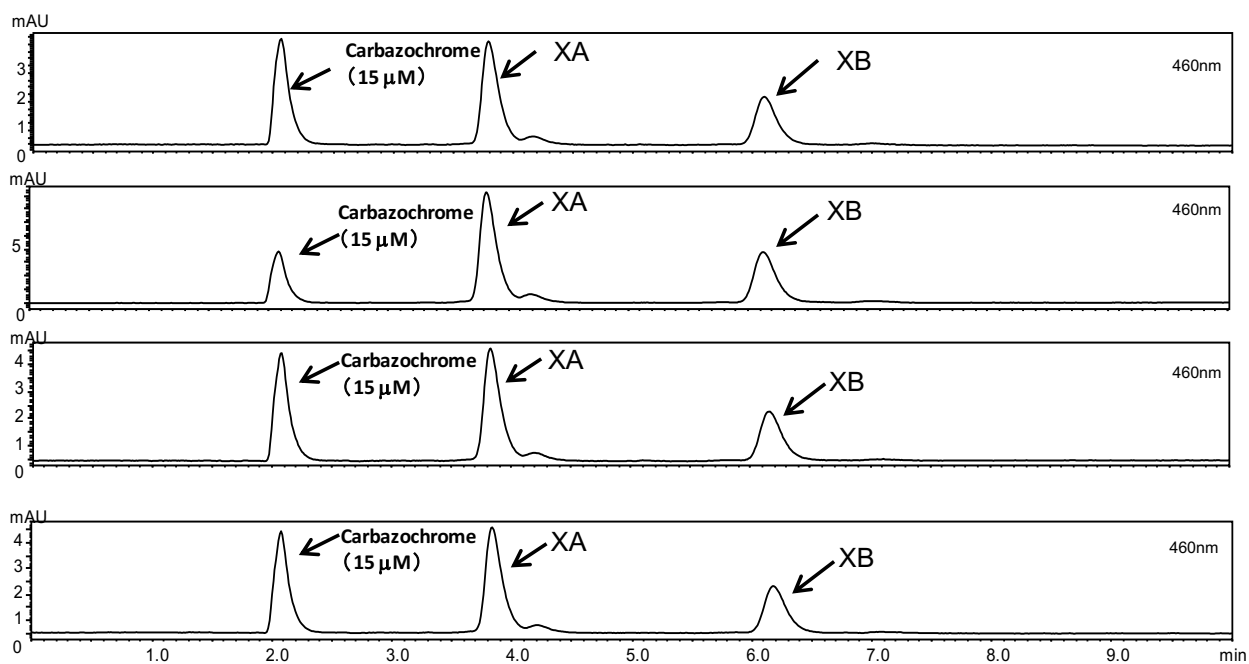


Fig. 13 各メーカーのベニコウジ黄色素でのシングルリファレンス HPLC 定量法

Table 5 異なる HPLC 分析条件におけるキサントモナシン類の定量値

HPLC 分析条件 (カラム) 移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液 移動相 B: 0.1%ギ酸メタノール	シングルリファレンス 添加濃度 ( $\mu\text{M}$ )	XA 定量値 ( $\mu\text{mol/g}$ ) $\pm$ SD	XB 定量値 ( $\mu\text{mol/g}$ ) $\pm$ SD
TSKgel ODS-100V [Tosoh, Co.] A/B: 30/70	5.0	9.1 $\pm$ 0.10	3.3 $\pm$ 0.04
	7.5	9.3 $\pm$ 0.12	3.3 $\pm$ 0.06
	15.0	9.1 $\pm$ 0.04	3.3 $\pm$ 0.03
Xbridge C18 [Waters, Co.] A/B: 20/80	5.0	8.8 $\pm$ 0.05	3.0 $\pm$ 0.08
	7.5	9.0 $\pm$ 0.09	3.2 $\pm$ 0.01
	15.0	8.9 $\pm$ 0.10	3.1 $\pm$ 0.01
Inertsil ODS-2 [GL Science, Co.] A/B: 15/85	5.0	9.1 $\pm$ 0.07	3.1 $\pm$ 0.03
	7.5	9.4 $\pm$ 0.09	3.3 $\pm$ 0.07
	15.0	9.2 $\pm$ 0.08	3.2 $\pm$ 0.03
YMC-Pack Pro C18 RS [YMC, Co.] A/B: 20/80	5.0	9.0 $\pm$ 0.18	3.3 $\pm$ 0.09
	7.5	9.2 $\pm$ 0.12	3.3 $\pm$ 0.06
	15.0	9.2 $\pm$ 0.03	3.3 $\pm$ 0.05
KINETEX [Phenomenex, Co.] A/B: 90/10 (0 min) $\rightarrow$ 10/90 (10 min) $\rightarrow$ 5/95 (10.1 min) $\rightarrow$ 5/95 (15 min)	5.0	9.8 $\pm$ 0.15	3.3 $\pm$ 0.07
	7.5	9.4 $\pm$ 0.06	3.2 $\pm$ 0.03
	15.0	9.1 $\pm$ 0.04	3.1 $\pm$ 0.03



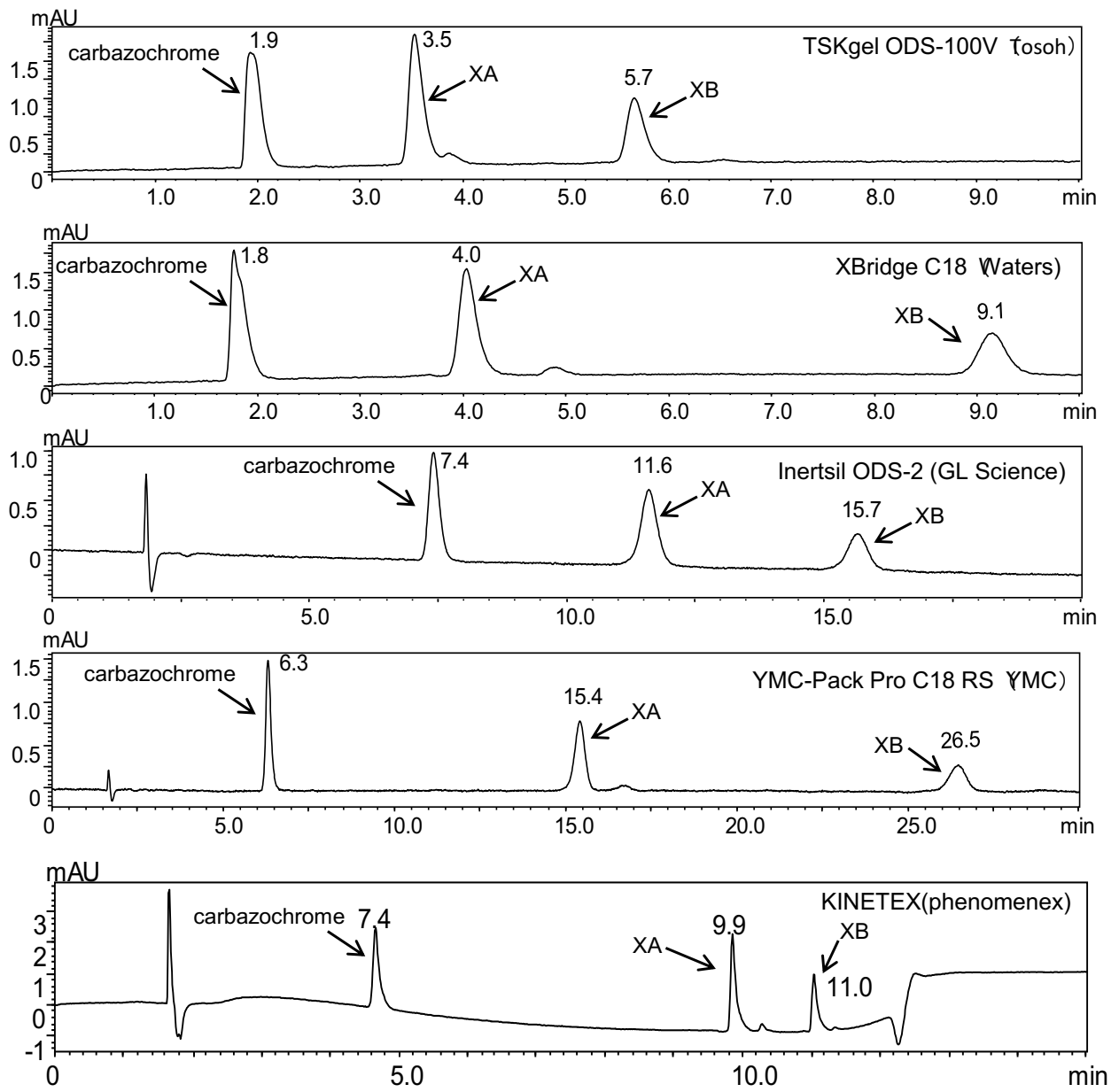


Fig. 13 異なるカラムでのベニコウジ黄色素のシングルリファレンス HPLC 定量法