

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和6年度研究分担報告書

既存添加物の成分組成に関する研究

既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

研究分担者 井之上浩一 立命館大学薬学部 臨床分析化学研究室 教授

研究要旨 スピルリナ色素は、第10版食品添加物公定書においてスピルリナ(*Arthrospira platensis*(*Spirulina platensis*))の全藻から得られた、フィコシアニンを主成分とするものと定義されている。フィコシアニンは青色の発色団を分子内に有するタンパク質で、食用色素として用いられる他、その抗酸化活性や神経保護作用からスーパーフードとしても近年着目されており、今後適切な成分規格を策定していく必要があると考えられる。公定書には確認試験として、定性手法が定められている。本年度の研究において、まず本確認試験によりスピルリナ色素を定性可能か、市販の青色素製品(スピルリナ色素2製品、クチナシ青色素製品及びバタフライピー色素製品)を比較対照として確認した。確認試験では蛍光あるいは試液を添加した際の発色を確認するが、2試験においてスピルリナ含有試料のみが反応を示した。一方で、定量手法は定められていないため、続いて高速液体クロマトグラフィーによる分析を試みた。検討にあたり、一般的な逆相オクタデシルシリルカラムと、細孔径の大きいカラムを比較した。

研究協力者

高山卓大 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

スピルリナ色素(*Spirulina color*)は、第10版食品添加物公定書(以降、公定書)において「本品は、スピルリナ(*Arthrospira platensis*(*Spirulina platensis*))の全藻から得られた、フィコシアニン(以降、PYC)を主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」と定義されている¹⁾。PYCは青色の発色団を分子内に有するタンパク質(分子量 30 kDa)で、発色団は分子量 600 Da 程度の低分子フィコシアノビルリンである²⁾。スピルリナ色素は食用色素として用いられる他、近年、PYCが抗酸化作用、神経保護作用さらには抗がん作用を有することが報告され^{3,4)}、スピルリナ色素を含有する製品がスーパーフードとしても商業的に注目されている。公定書にはスピルリナ色素の確認試験とし

て、定性試験法に規格が存在する。一方で、その含有量評価は色価測定に留まっており、より正確な定量評価法が求められる。

そこで本研究課題では、汎用される定性及び定量分析可能な理化学機器である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に基づくスピルリナ色素の定性および定量法の開発を目指した。定量の対象物質としては、スピルリナ色素の主成分はPYCとした。令和5年度の検討において、既存の確認試験において、4種(スピルリナ色素2種、クチナシ青色素及びバタフライピー色素(チョウマメ色素))の市販青色素製品を識別可能であるが、定量的評価への適用は困難と考えられた。そこで、全長PYCの検出が可能となるか検討する目的で、バイオカラムを用いたHPLC法を検討した。その結果、スピルリナ色素製品2種において検出波長 620 nm (PYCの極大吸収領域)で選択的に検出されるピークが複数本観測された。今年度の検討としては、PYC

含有製剤の1残基タンパク質消化断片において発色団フィコシアノビリンの定性分析を、LC-四重極飛行時間型質量分析計(QToF/MS)を用いて実施した。これにより、定量の対象としているタンパク質が PYC 由来であることを検証した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

青色素 4 製品, スピルリナ色素 2 製品(製品 1=A 及び製品 2=B), クチナシ青色素 1 製品(C) 及びバタフライピー色素 1 製品(D))は、それぞれ市場より購入したものをを用いた。なおバタフライピー色素は、チョウマメ抽出液の濃縮物であり、アントシアニンを主成分とする。

アセトニトリル(HPLC 用), メタノール(HPLC 用), ギ酸(LC/MS 用, 約 99%), 1 mol/L 塩酸(容量分析用)及び水酸化カリウム(試薬特級)は富士フイルム和光純薬社製のものをを用いた。Leucine Aminopeptidase (microsomal from porcine kidney), Prolidase from porcine kidney 及び Pepsin from porcine gastric mucosa lyophilized powder ($\geq 3,200$ units/mg protein)は Sigma Aldrich 社製のものをを用いた。Pronase E (Activity ≥ 4000 U/mg)は MedChemExpress 社製のものをを用いた。Thymol は東京化成工業社製のものをを用いた。りん酸二水素カリウム(試薬特級)及びりん酸水素二カリウム(試薬特級)はナカライテクス社製のものをを用いた。本研究に用いた超純水は、全て Milli-Q EQ7000 system (Merck 社製)にて精製したものをを用いた。

B-2) 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

遠心分離機：日立工機社製 Himac CF15RN

HPLC 装置：

Waters 社製 ACQUITY UPLC H-Class plus

ポンプ：Quaternary Solvent Manager

オートサンプラー：Sample Manager FTN-H

フォトダイオードアレイ検出器：PDA eλ
Detector

QToF/MS 装置：

Waters 社製 Xevo G2XS

イオン化条件：エレクトロスプレーイオン化
ポジティブモード

測定モード：MSE モード

B-3) 酵素消化法

酵素分解に用いる試薬の調製

Pepsine：超純水にて希釈した 20 mmol/L 塩酸を用いて 900 U/mL になるよう溶解した。

Thymol：超純水にて希釈した 20 mmol/L 塩酸に 2 mg/mL になるよう溶解した。

Pronase E：10 U/mL に 10 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH 7.4)で溶解した。

Leucine Aminopeptidase：超純水にて調製した 10 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH 7.4)を用いて 20 U/mL になるよう溶解した。

Prolidase：超純水にて調製した 10 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH 7.4)を用いて 200 U/mL になるよう溶解した。

酵素消化条件

本条件は既報を参考にして設定した⁵⁾。40 mg/mL に調製した各色素製剤の 5 μ L に対して 10 μ L の Pepsine 及び 10 μ L の Thymol を添加し 37°C で 3 時間反応させた。その後、20 μ L の 10 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH 7.4), 10 μ L の 260 mmol/L 水酸化カリウム溶液及び 10 μ L の Pronase E を添加し、37°C で 3 時間反応させた。終了後、Leucine Aminopeptidase 及び Prolidase をそれぞれ 10 μ L 加え、37°C で 24 時間反応させた。最終溶液に対して 15 μ L の超純水を加え、合計で 100 μ L の溶液とした。この溶液の 10 μ L を分注し、40 μ L のメタノールを加え、LC-MS 測定に適切となる様に除タンパク質を行った(遠心分離：3000 $\times$ g, 4°C, 5 min)。得られた上清の 40 μ L と超純水の 40 μ L を攪拌し、測定溶液(色素製剤として 200 μ g/mL)とした。

B-4) HPLC 分離分析

粉末の対象試料は超純水により溶解し、400 $\mu\text{g/mL}$ までアセトニトリル/超純水(10/90, *V/V*)にて希釈した。移動相には、A液：0.1 vol%ギ酸水溶液/B液：0.1 vol%ギ酸アセトニトリルを使用し、以下に示すグラジエント条件にて、18.5分の分析を行った。

カラム：Accura Triart Bio C18(2.1 $\times$ 100 mm, 1.9 μm , YMC 社製)

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

流速：0.4 mL/min

グラジエント条件 B% (min)：10(0)-10(0.5)-80(15)-98(15.1)-98(16)-10(16.1)-10(18.5)

検出波長：620 nm

注入量：5 μL

C. 結果及び考察

C-1) 酵素消化法による各色素製剤の結果

国内で市販される青色素製品(A~D)を用い、期待される酵素消化断片がスピルリナ色素含有2製品(A, B)のみで検出されるか検討した。分析対象とするPYCの構造を図1に示した。図2-(a)~(d)には検出波長域 200-800 nmでのクロマトグラムの結果を示した。いずれのクロマトグラムにおいてもいくつかのピークが認められた。特にスピルリナ色素含有2製品では、0.95分及び1.25分に共通してピークが認められた。分析モードが逆相系であることを考慮すると、これらは高極性な物質でありタンパク質の消化断片であると考えられる。また、8.68分及び8.93分に全製品共通のピークが認められているが、これらは消化に用いた酵素のチモール由来のピークである。図3-(a)~(d)には検出波長 620 nmでのクロマトグラムの結果を示した。(a)スピルリナ色素、(c)クチナシ青色素、(d)バタフライピー色素の製品に明瞭なピークが観察された。特に(a)スピルリナ色素に関しては6.26分に大きなピークが検出されていたため、このピークの同定を試みた。図4-(a)及び(b)にはMSクロマトグラム(トータルイオンクロマトグラム)及び6.26分のピークのMSスペクトルを示した。基準ピークとして m/z 353.6497が、関連ピ

ークとして m/z 706.2921が検出された。前者は m/z 706.2921の2価イオンであると考えられる。既報によると、フィコシアノビリンの構造は図5-(a)とされている。仮にこの構造でプロトン化されたイオンの精密質量を算出すると m/z 708.3066となり、検出された値は2.0145分小さいことになる。これは水素2原子分の質量に相当するため、今回検出されたイオンはフィコシアノビリンの前駆物質であるジヒドロビリベルジンである可能性が高い(図5-(b))。ジヒドロビリベルジンが酵素的に還元されるとフィコシアノビリンになると知られ両者とも青色を示すため、スピルリナ色素に含まれている可能性はある。一方で、酵素消化の過程で変化している可能性も否定はできないため、この構造が正確にジヒドロビリベルジンであることは、より定性性能が高い機器分析で確認していく必要がある。また、断片の標準品が入手不可能であるため、酵素消化の効率率は理論的に算出することは困難であること、さらにスピルリナパウダーからは、目的の断片が検出されなかったことから感度の面で限界があり、定量的な評価方法としては不向きである。従って、構造が明確になった後、その断片を含む全長タンパク質として定量法を設定することが望ましい。今後、定性的評価と定量法の確立を並行して実施していく予定である。

D. 結論

本研究では、市販の青色素製品を検討対象とし、スピルリナ色素に含まれる色素タンパク質がPYCであることを確認する目的で酵素消化を実施した。その結果、市販のスピルリナ色素には、LC分析において検出波長 620 nmで特徴的なピークが観察され、ESI pos.モードで m/z 706.2921のイオンを与えた。フィコシアノビリンが発色団だと仮定して、そのプロトン付加した精密質量は理論上 m/z 708.3066となるため、PYCとは異なる形態(例えばジヒドロビリベルジン)で存在している可能性が示唆された。今後は下記の方針で研究を進めていく予定である。

なし

・タンパク質直接分析法の更なる検討 (分離分析条件と定量ピークの選定)

・酵素消化断片の構造決定(X線構造解析法や核磁気共鳴法を予定)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

以上を検討していくことで、正確かつ信頼性のあるスピルリナ色素の分離分析法が構築できると考える。

E. 参考文献

- 1) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省 (2017).
- 2) Schram BL, Kroes HH. Structure of phycocyanobilin. *Eur J Biochem.*, 1971; 30: 581-594.
- 3) Ashaolu TJ, Samborska K, Lee CC, Tomas M, Capanoglu E, Tarhan Ö, Taze B, Jafari SM. Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications. *Int J Biol Macromol.*, 2021; 193: 2320-2331.
- 4) Park WS, Kim HJ, Li M, Lim DH, Kim J, Kwak SS, Kang CM, Ferruzzi MG, Ahn MJ. Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin, in Spirulina Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 2018; 23: 2065.
- 5) Zhang G, Huang G, Xiao L, Mitchell AE. Determination of advanced glycation endproducts by LC-MS/MS in raw and roasted almonds (*Prunus dulcis*). *J Agric Food Chem.*, 2011; 59: 12037-46.

F. 研究業績

1. 学会発表等

なし

2-1. 論文発表等

なし

2-2. 総説

なし

2-3. 単行本

フィコシアニン: $\alpha\beta$

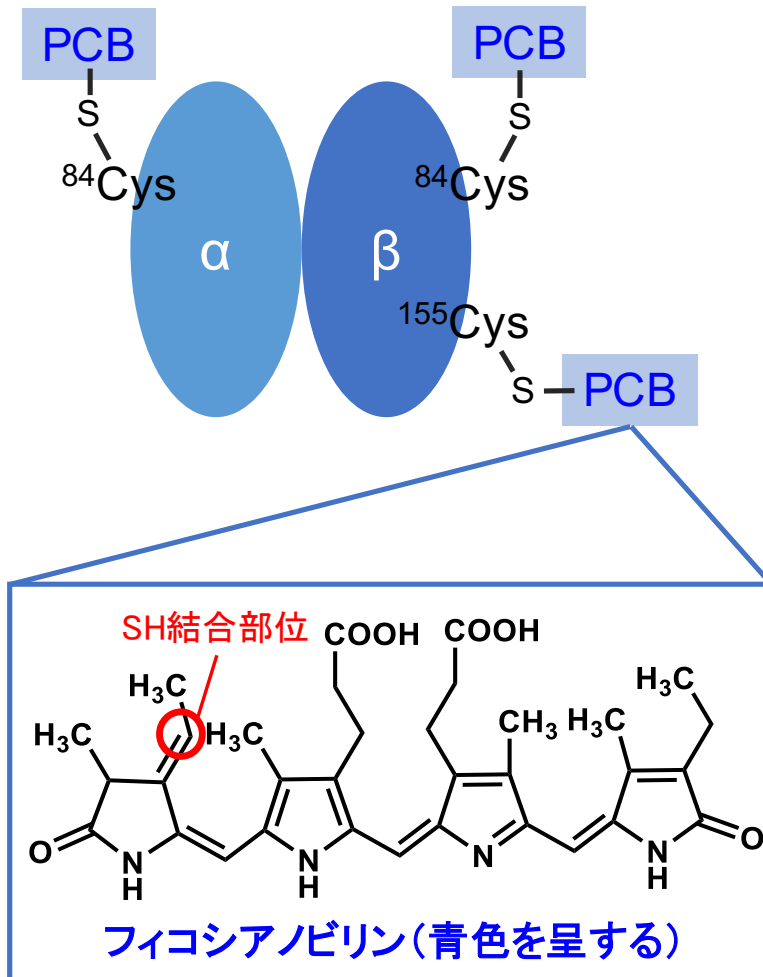


図 1. 分析対象物質 PYC の構造

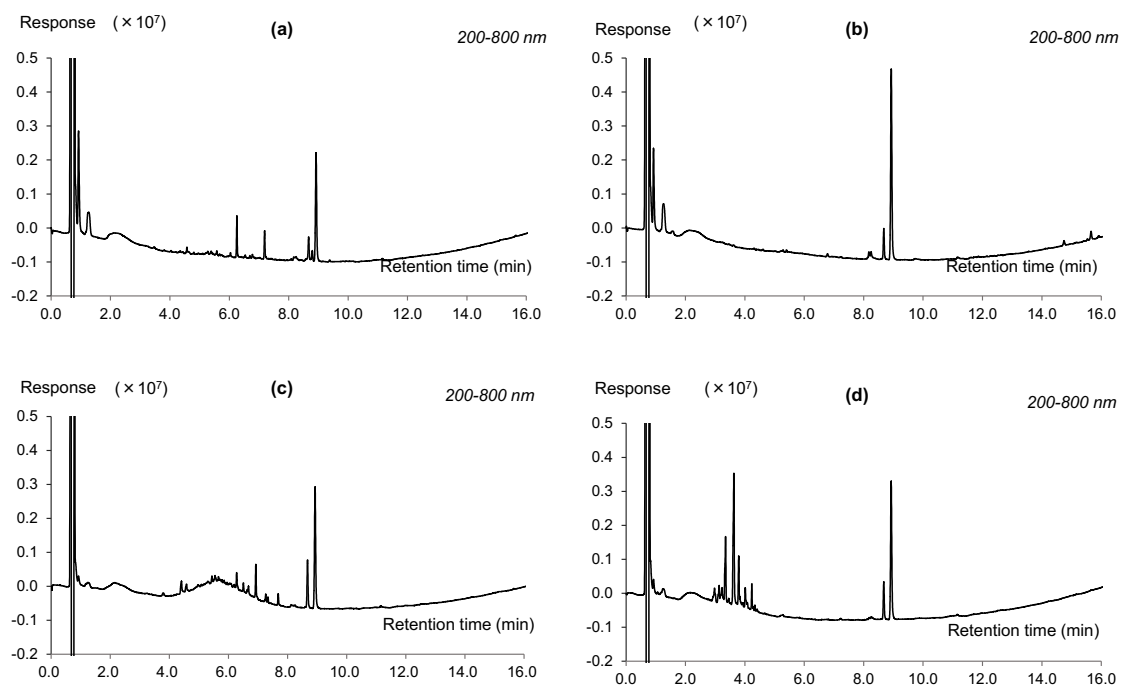


図 2. 酵素消化後の断片のクロマトグラム(200-800 nm)

(a)スピルリナ色素 1, A

(b)スピルリナ色素 2, B

(c) クチナシ青色素, C

(d)バタフライピー色素, D

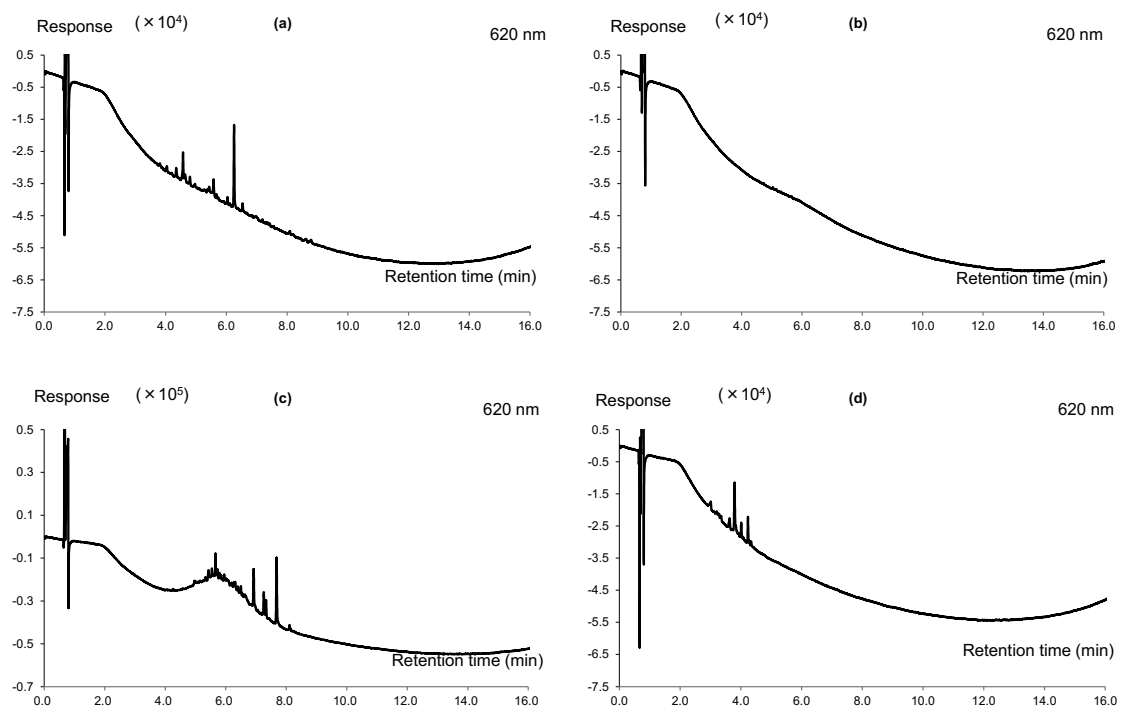


図 3. 酵素消化後の断片のクロマトグラム(620 nm)

(a)スピルリナ色素 1, A

(b)スピルリナ色素 2, B

(c) クチナシ青色素, C

(d)バタフライピー色素, D

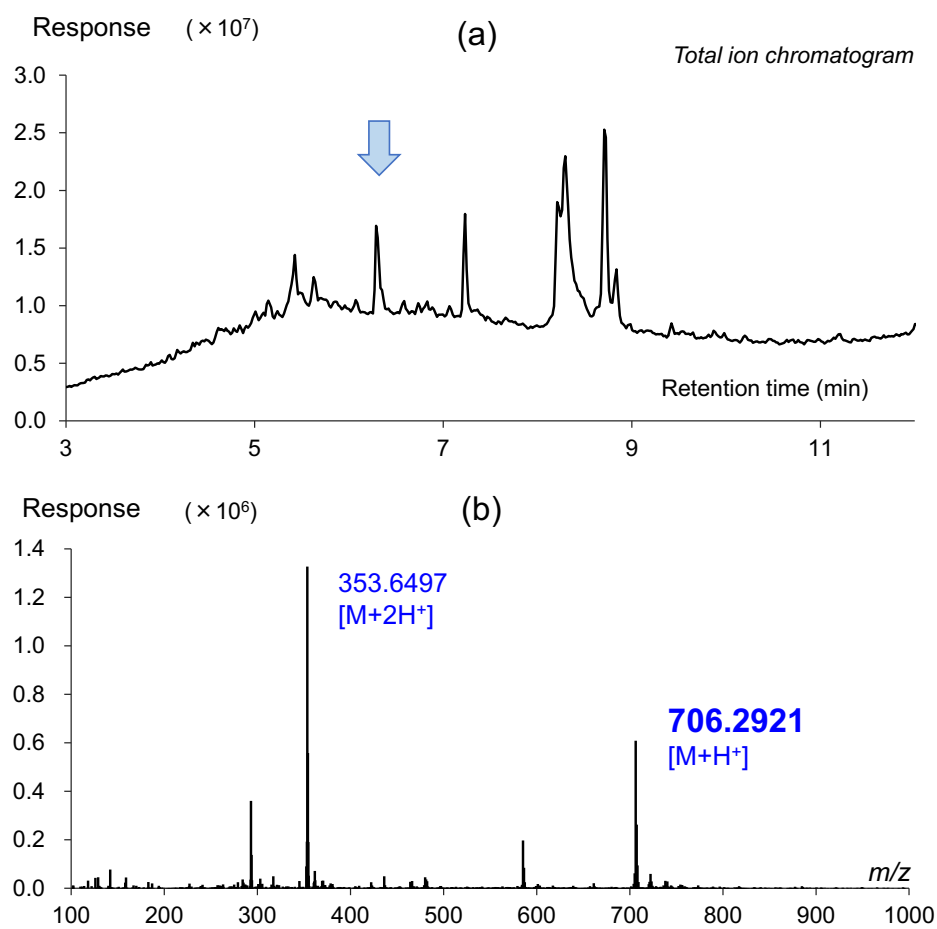


図 4. スピルリナ色素 LC-MS の測定結果

(a) LC-MS のクロマトグラム

(b) 6.29 分の MS スペクトル

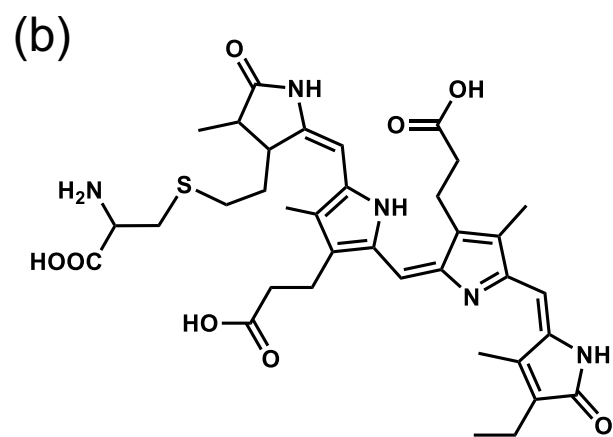
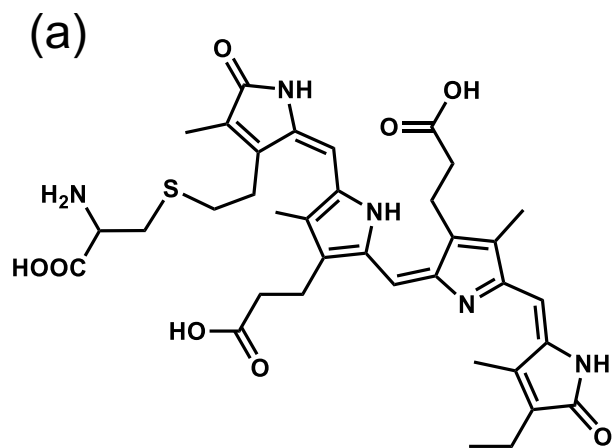


図 5. スピルリナ色素の発色団の構造

(a) ジヒドロビリベルジン

(b) フィコシアノビルン