

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に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5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9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）を用いて確かめた。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。まず初めに、市販の青色素製品を含めて4種類（スピルリナ色素2製品、クチナシ青色素1製品及びバタフライピー色素1製品）を、公定書記載の確認試験により定性した。その結果から、各色素を識別することが可能か、極大吸収波長の確認を行った。次に、PYCの極大吸収波長と考えられる 620 nm を検出波長として、HPLC 分析に用いる分析カラムの検討を行った。検討には、汎用されているオクタデシルシリル基 (ODS) が修飾された逆相クロマトグラフィー系カラムを用いた。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

検討に用いた青色素製剤、スピルリナ色素 2 製品(A 及び 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 DIC ライフテック株式会社、ジャパンアルジェ 株式会社、共立食品株式会社及び日本アドバ ンストアグリ株式会社から購入した。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%)、ク エン酸一水和物、硫酸アンモニウム、40%塩化 鉄 (III) 溶液及び次亜塩素酸ナトリウムは富 士フイルム和光純薬社製のものをを用いた。超 純水は Milli-Q EQ7000 system (Merck 社製) に て生成したものを採取し、試験に用いた。

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
検出器：PDA eλ Detector

B-3) 公定書確認試験

第 10 版公定書 C 項「試薬・試液等」に従っ て、クエン酸緩衝液 (pH 6.0)、塩化鉄(III)試液、 次亜塩素酸ナトリウム試液を調製した。第 10 版 公定書のスピルリナ色素の成分規格の記載に 従って、確認試験(1)～(6)に該当する試験を実施 した¹⁾。なお、色価が不明の製品もあったため、 公定書記載の色価 25 換算は行わず各製剤 0.4 g を試験に供した。確認試験(6)における極大吸収 波長の確認には、装置に示した分光光度計を用 い、210 nm～800 nm の波長帯における吸光スペ クトルを取得した。その他の確認試験においては 蛍光や発色を目視により判断した。

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 µg/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：Shim-Pack Scepter C18-120 (4.6×150 mm, 5 µm, 島津社製) 及び Accura Triart Bio C18 (2.1×100 mm, 1.9 µm, YMC 社製)

カラム温度：40℃

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) 公定書確認試験

国内で市販される 4 つの青色素製剤を用い、 スピルリナ色素の成分規格の記載の確認試験 により定性が可能かを検討した。図 1-(a)～(f)に 確認試験(1)～(6)の結果を示した。確認試験(1) において、薄層クロマトグラフィー用シリカシ ート (TLC) にスポットした全ての製品(A, B, C,D)で 365 nm の励起波長において赤色の蛍光 が確認された。確認試験(2)において、各溶液を 90℃で 30 分間加熱後、得られた溶液の上清を (1)と同様に TLC にスポットし、蛍光を確認し たところ、スピルリナ色素 2 製品(A 及び B)に おいて赤色蛍光の消失が認められた。確認試験 (3)において、各溶液に硫酸アンモニウムを規定 量加えたところ、全ての製品(A, B, C, D)で青色 沈殿が認められた。確認試験(4)において、塩化 鉄(III)試液を規定量加え、20 分間放置したとこ ろ、全製品で明確な色調の変化は認められず、 スピルリナ色素 2 製品(A 及び B)はこの確認試 験で判別することは困難であった。確認試験(5) において、次亜塩素酸ナトリウム試液を規定量 加えたところ、スピルリナ色素 2 製品(A 及び B) で淡黄色への色調変化が認められた。確認試験 (6)において、400 µg/mL 溶液の吸収波長を確認 したところ、全ての製剤において波長 620 nm 周

辺に極大吸収部が認められた。スピルリナ色素含有製剤 2 製品(A 及び B)では、クチナシ青色素製品(C)やバタフライピー色素製品(D)と比べ、極大吸収部が僅かに長波長側ではあったが、完全分離は不可能と考えられた。以上の結果を表 1 に要約した。確認試験(2)及び(5)によりスピルリナ色素の判別は可能であったが、いずれも明確な反応とは言い難く、定量的測定に応用できるとは考えられなかった。そこで、620 nm を検出波長とした HPLC 測定法の検討を実施した。

C-2) HPLC 分離分析の検討

C-1 の確認試験(6)から、代表的な青色素 4 製剤(A, B, C, D)はいずれも 620 nm 周辺に極大吸収部を有することが示された。従って、この波長を検出波長として、HPLC に基づく分離分析を検討した。図 2-(a)~(d)には分析カラムとして Shim-Pak Scepter C18-120 を用いた際のクロマトグラムを示した。検討した全色素製剤製品において、何本かのピークが認められた一方で、分離は不十分であり、特にスピルリナ色素製剤 2 製品(A 及び B)においては著しいテーリングが認められた。バタフライピー色素製品(D)の色素成分はアントシアニンの一種であるテルナチン、クチナシ青の色素成分はゲニピンとタンパク質加水分解物の反応物として知られている。PYC は分子量 30 kDa 程度のタンパク質であり、他の色素製剤とは異なる物理化学的特性を有するため、次に非特異的吸着抑制と広い細孔径を有することから、タンパク質測定に適切なカラムでの分析検討を実施した。今回、YMC 社製の Accura Triart Bio C18 にて HPLC 分析を行った結果を図 3-(a)~(d)に示す。いずれもピークが良好な形状で認められ、スピルリナ色素含有製剤製品のみに共通して、溶出時間 9-11 分ほどにピークが認められた。これらのピークは PYC 由来であると考えられるが、複数本認められたことから凝集体や同等の発色団を有した異性体の存在が考えられる。今後、溶出条件を最適化し、定量ピークを選定していくことで、スピルリナ色素の適切な定量分析法を構築可能と考えられた。

D. 結論

本研究では、まず市販の青色素製剤を検討対象として、第 10 版公定書のスピルリナ色素の成分規格の確認試験により定性が可能か確かめた。確認試験(2)及び(5)の 2 試験においてスピルリナ色素製剤製品を識別可能であったが、変化は明確ではなく、定量的評価は不可能であると考えられたため、HPLC による分析を試みることにした。一般的な ODS 系カラムでは、ピークは観察できたものの、各色素製剤で分離は不十分であり、かつ目的ピークがテーリングする傾向が認められた。一方で、タンパク質分析に適切なカラムを用いたところ、良好なピークパフォーマンスを認めた。今後は下記について、検討を進めていく。

- ・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）
- ・トリプシン消化断片の分析検討

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 10 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.

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

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

フィコシアニン: $\alpha\beta$

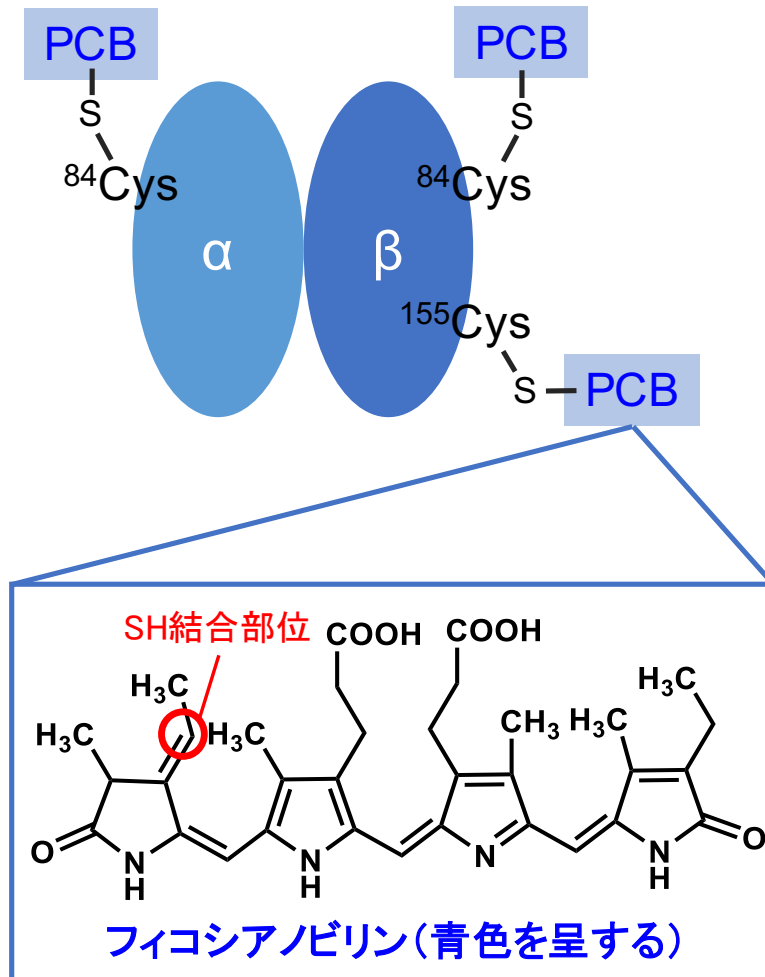


図 1. 分析対象物質 PYC の構造

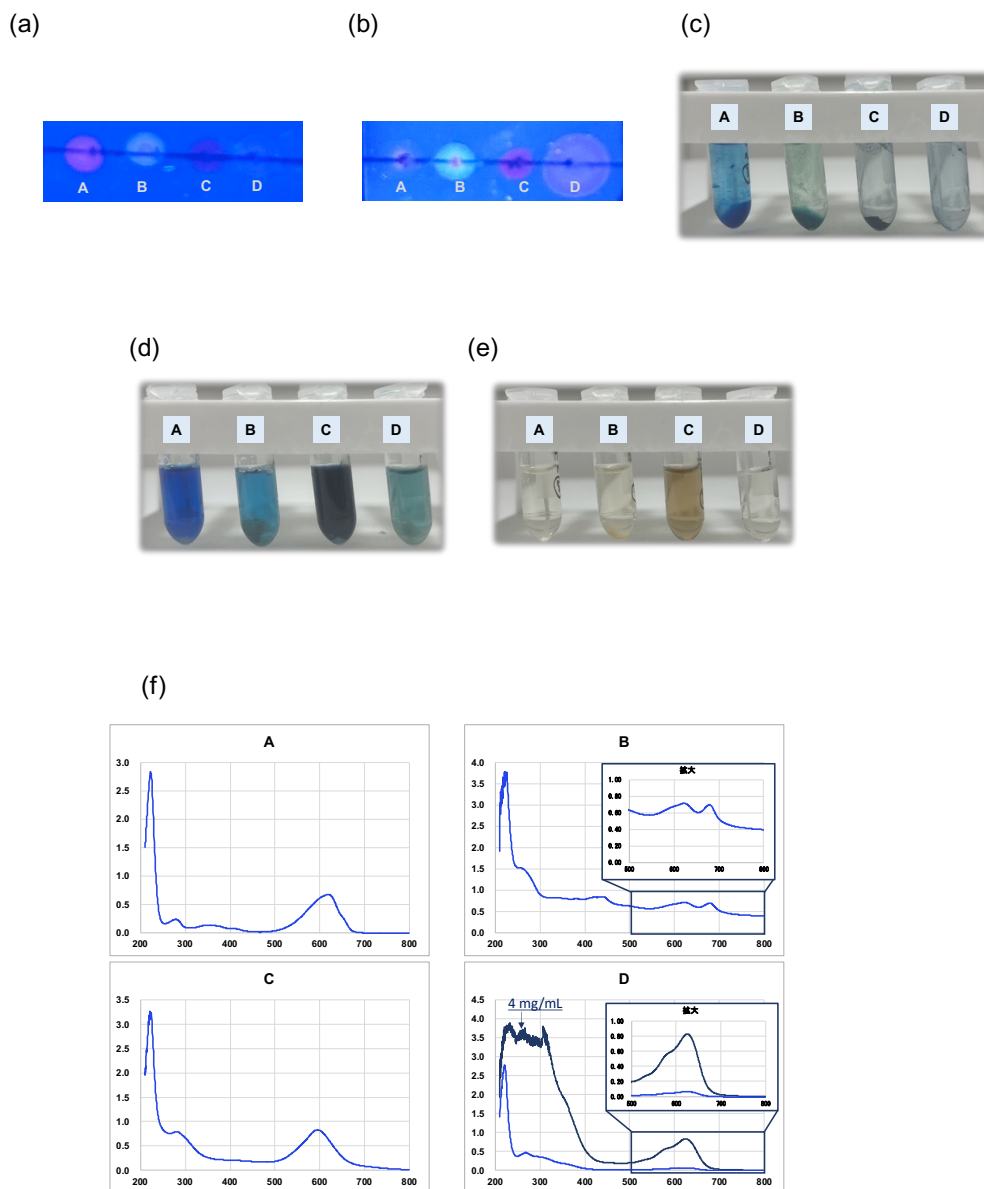


図 2. 第 10 版公定書のスピルリナ色素の確認試験の結果

(a) 確認試験(1)

(b) 確認試験(2)

(c) 確認試験(3)

(d) 確認試験(4)

(e) 確認試験(5)

(f) 確認試験(6)

※各図表中 A：スピルリナ色素 1，B：スピルリナ色素 2，

C：クチナシ青色素，D：バタフライピー色素

表 1. 第 10 版公定書のスピルリナ色素の確認試験の結果の要約

確認試験	スピルリナ色素 1	スピルリナ色素 2	クチナシ青色素	バタフライピー 色素
(1)	○	○	○	○
(2)	○	○	×	×
(3)	○	○	○	×
(4)	×	×	×	×
(5)	○	○	×	×
(6)	○	○	○	○

○：公定書の基準反応が認められたもの，×：基準反応が認められなかったもの

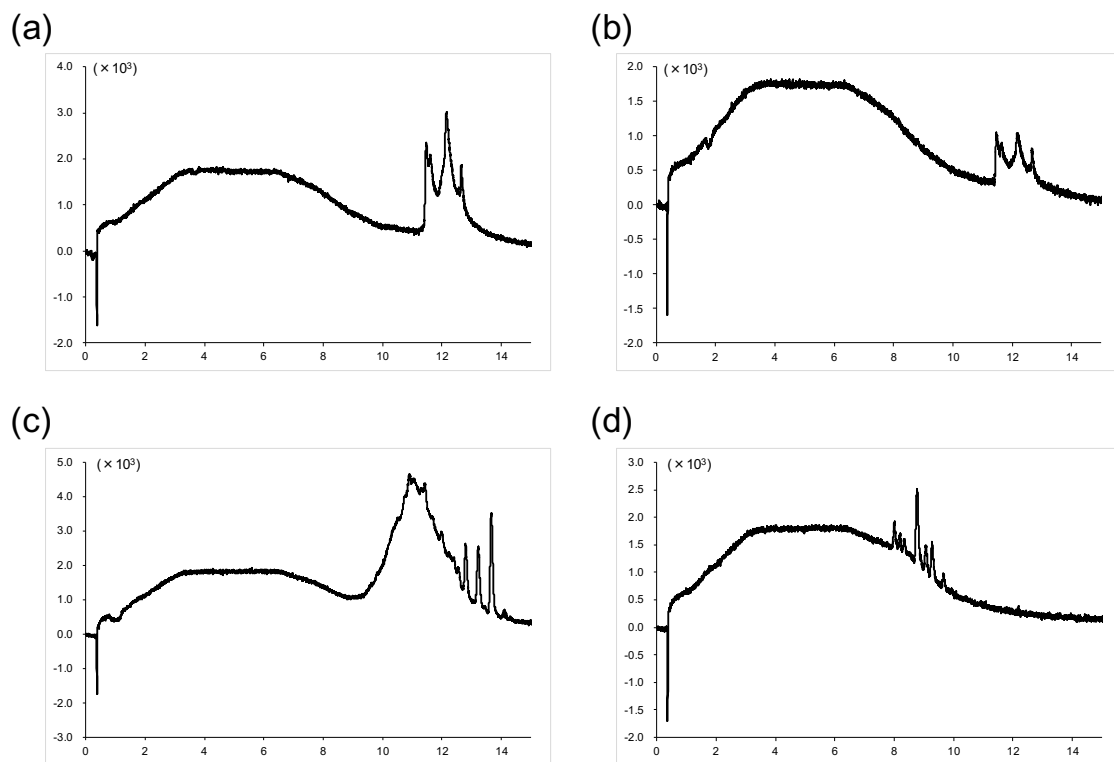


図 3. 分析カラム Shim-pack Scepter C18-120 を用いた際の HPLC クロマトグラム

- (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

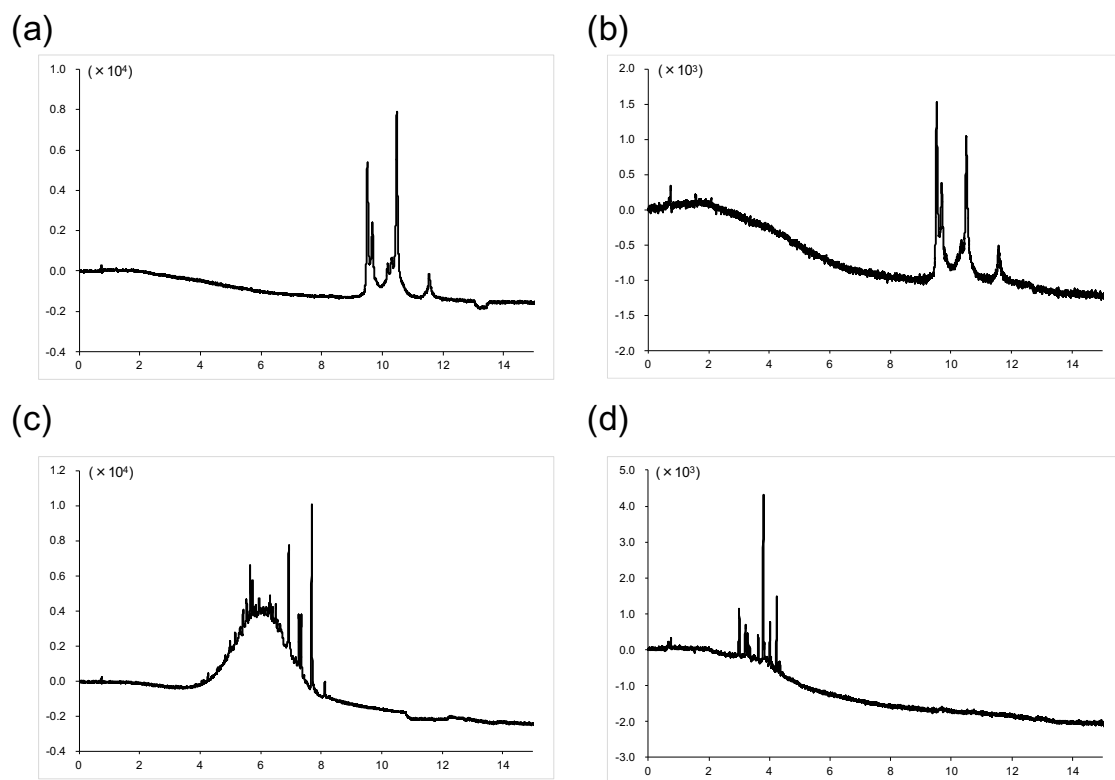


図 4. 分析カラム Accura Triart Bio C18 を用いた際の HPLC クロマトグラム

- (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