

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

ムラサキヤマイモ色素に含まれるアントシアニン化合物の定量的分析法の開発

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 ムラサキヤマイモ色素(Purple yam color)は、ヤマイモ(*Dioscorea alata* L.)の塊根から得られた、シアニジンアシルグルコシド等を主成分とするものである。ジャム、ジュースやアイスクリーム等の食品の着色の他、化粧品や医薬品にも使用されることがある。一方で、いまだ適切な規格基準が設定されていない(第6版自主規格のみ)ため、定性及び定量のための基礎検討を実施する必要がある。シアニジンアシルグルコシドはアントシアニン配糖体の一種であり、糖の形態やアシル基の種類に応じて様々な種類がある。本年度の研究において、まず分析対象とするアントシアニン類のプロファイリングを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-質量分析計(MS)を用いて行った。HPLCの条件を決定する目的で、5本の分析カラムを検討した結果、TSKgel ODS-100Zカラムにおいて複数本のピーク(波長550 nm程度)が観察された。本系を用いて、LC-MSにより高含量なアントシアニン類の同定を試みた。その結果、3種の相対的に高強度なピークに関して、アグリコンと配糖体のタイプを推定することができた。また、これらの成分の標準品を獲得するために高速向流クロマトグラフィーを用いた精製を検討しており、その初期検討として分配係数の算出を行った。

研究協力者

高山卓大 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

ムラサキヤマイモ色素(Purple yam color)は、「本品は、ヤマイモ(*Dioscorea alata* L.)の塊根から得られた、シアニジンアシルグルコシド(CAG)を主成分とするものである。」と定義されている¹⁾。ジャム、ジュースやアイスクリーム等の食品の着色の他、化粧品や医薬品にも使用されることがある。類似品にムラサキイモ色素があるが、ムラサキヤマイモ色素の方がやや紫味が少ない。耐光性はほぼ同等であるが、耐熱性に優れており、80℃で2時間加熱してもほとんど退色や色調の変化がない。そのため加熱工程を含む食品の着色に適している。また、アントシアニン成分に基づく抗酸化活性も期待さ

れており、市場流通する可能性は十分に考えられる²⁾。一方で、本邦においては現在、適切な規格基準が設定されていない(第6版自主規格のみ)ため、定性及び定量のための基礎検討を実施する必要がある。

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)に基づくムラサキヤマイモ色素の定性および定量法の開発を目指した。定量の対象物質は主成分であるCAGとするのが適切であると考えた。一方で、CAGは糖部分の構造やアシル基の種類に応じて種類が存在する。既報では、これらをHPLC-高分解能質量分析計(HRMS)にてプロファイリングしているケースが多いため³⁾、今年度はLC-四重極飛行時間型質量分析計(QToF/MS)を用いて、定量の対象とするCAGの設定を実施すること

とした。また、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC)を用いた標準品獲得に向けた基礎検討を併せて実施した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ムラサキヤマイモ色素の原体 2 ロット(国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部保存番号：C2352 及び C2375)を試験に用いた。

メタノール(HPLC 用), ギ酸(LC/MS 用, 約 99%), *tert*-ブトキシメチルエーテル(試薬特級), 1-ブタノール(試薬特級), アセトニトリル(HPLC 用), クエン酸一水和物及びトリフルオロ酢酸(試薬特級)は富士フイルム和光純薬社製のものを用いた。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：測定条件検討及び分配係数の算出
島津製作所社製

ポンプ：LC-20AD

オートサンプラー：SIL-20AC

コントローラー：CBM-20A

フォトダイオードアレイ検出器：SPD-M20A

カラムオーブン：CTO-10A

LC-MS 装置：

HPLC 装置部：

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 装置部：

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) 測定対象の原体の調製

測定対象の原体の 1 mL を取り, 9 mL メタノールを加えて 10 倍希釈物を調製した。この 100 μ L を取り, 400 μ L の水/メタノール=1/1 混合溶液により希釈して, 合計で 50 倍希釈物として測定に供した。

B-4) 分配係数の算出

有機系溶媒としては, *tert*-ブトキシメチルエーテル, 1-ブタノール, アセトニトリルを水系溶媒として水を選択し, トリフルオロ酢酸を添加して検討した。溶媒の混合比率は次の通りとした：3.5/2.0/1.5/4.5/0.01, 3.0/2.5/1.5/4.5/0.01, 2.5/3.0/1.5/4.5/0.01, 2.0/3.5/1.5/4.5/0.01 及び 1.5/4.0/1.5/4.5/0.01 (V/V/V/V)。これらの溶液をそれぞれ 5 mL 調製し, 5 分間静置した後, 100 μ L の色素原体をそれぞれ添加して十分に攪拌した。その後, 5 分間静置し, 分配した上相及び下相を 100 μ L 分取して溶媒留去した。乾固した残差を水/メタノール=8/2 (V/V)溶液の 100 μ L に溶解し, HPLC 測定に供した。分配係数は上相のピーク面積/下相のピーク面積として算出した。

B-5) HPLC 分離分析

移動相には, A 液：0.1 vol% ギ酸水溶液/B 液：0.1 vol% ギ酸含有メタノールを使用し, 以下に示すグラジエント条件にて, 30 分の分析を行った。

カラム：以下のカラムを検討した。

①TSKgel ODS-100Z column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, 東ソー社製)

②TSKgel ODS-100V column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, 東ソー社製)

③Xbridge C18 column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, Waters 社製)

④YMC-PackPrp C18 RS column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, YMC 社製)

⑤Inertsil ODS-2 column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, GL Sciences 社製)

LC-MS 測定においては, MS 分析に適切な流速

に設定できるように TSKgel ODS-100Z column (2.0×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)を用いた.

カラム温度: 40℃

流速: HPLC 測定時; 1.0 mL/min, LC-MS 測定時; 0.3 mL/min

グラジエント条件 B% (min): 20(0)-40(20)-95(20.1)-95(25.1)-20(25.2)-20(30)

検出波長: 200-800 nm

注入量: 10 μL

C. 結果及び考察

C-1) 色素原体の分析及び成分同定

まず, ムラサキヤマイモ色素原体について, 既存の食品添加物であるムラサキイモ色素と同等の試験を行い, 極大波長を確かめた. 図 1-(a)及び(b)に希釈液の外観(pH3.0)と吸光スペクトルを示した. 結果として赤〜暗赤色を示し, 極大吸収波長は 520 nm 周辺に認められていたため, 報告通りムラサキイモ色素と同等であることが検証できた. 図 2-(a)〜(e)には検出波長域 200-800 nm での 2 次元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. これらは極大吸収が 500 nm 周辺にあったため, 既報通り CAG の関連物質であることが示唆された. 特に TSKgel ODS-100Z カラムにおいてピーク形状が優れており, 複数本のピーク(検出波長 520 nm)が観察された. 従って, 本カラムを LC-MS 測定に適切となる様に内径及び粒子径を変更し, HPLC-HRMS を用いて, これらのピークの同定を試みた. 入手したロットごとのトータルイオンクロマトグラム及び 522 nm でのクロマトグラムを図 3-(a)〜(d)に示す. いずれも分析カラムの最適化時と同様の分離を得ることができ, 内 3 本は特に MS の検出強度が高かった. そこでこれらについて, MS 及び MS/MS スペクトルからの同定を試みた. その結果, 図 4-(a)〜(f)に示す通り, m/z 817.2230(9.76 分), m/z 787.2090(10.53 分)及び m/z 831.2368(12.42 分)の精密質量でイオンが検出された. これらはムラサキヤマイモの

抽出物に含まれるアントシアニン類として知られており, 本研究においても原体に含まれることが実証された. 一方で, m/z 831.2368 については報告がなく, 産地の違いや抽出工程の識別に使用できる可能性が考えられる. これらのアントシアニン類の MS/MS スペクトルを考えると, アグリコンがシアニジン骨格のものでプロダクトイオンの m/z 287.06 周辺, ペオニジン骨格のものでプロダクトイオンの m/z 301.07 周辺が検出されるという報告⁴⁾を踏まえると, それぞれのピークは図-5(a)〜(c)の構造を有することが考えられた.

C-2) CAG 標準品の獲得に向けた初期検討: HSCCC 条件検討のための分配係数算出

C-1 の検討結果から定量対象とする成分を設定できたため, 続いて HSCCC を用いた精製品の獲得に向けて分配係数の算出を行った. 結果は表 1 に示した通り, 3 本のピークが分配係数 1 周辺をとる溶媒系(*tert*-butyl methyl ether / 1-butanol / acetonitrile / water / trifluoroacetic acid=2.5/3.0/1.5/4.5/0.01, *V/V/V/V*)を設定することができた. 本条件を用いて HSCCC による単離精製を行うことで, 1 度に大量の純品を入手することが可能となると考えられる.

D. 結論

本研究では, 入手した色素原体の HPLC 測定条件を検討し, 3 本のピークが明確に観測可能な条件を設定した. また HPLC-HRMS 測定を通じて, 既報の事実と類似した結果を得ることができ, 明確に検出された成分については, CAG の構造を推定することが可能であった. また, 設定した分析条件を用いて, HSCCC による単離精製のための初期検討として分配係数の設定を行い. 今後は下記の計画で研究を進めていく.

- ・HSCCC を用いた色素原体からの CAG 類純品の獲得.
- ・獲得した CAG 純品の構造決定.

以上を検討していくことで、正確かつ信頼性のあるムラサキヤマイモ色素の定性及び定量的評価法が構築できると考える。

E. 参考文献

- 1) 第 6 版既存添加物自主規格, 日本食品添加物協会 (2025).
- 2) Qiu P, Chen J, Wu J, Wang Q, Hu Y, Li X, Shi H, Wang X. The effect of anthocyanin from *Dioscorea alata* L. after purification, identification on antioxidant capacity in mice. *Food Sci Nutr.*, 2023; 11: 6106-6115.
- 3) Vishnu VR, Jyothi AN, Sheela MN, Sreekumar J, Identification of anthocyanins in a purple yam (*Dioscorea alata*) accession and their in vitro antiproliferative activity. *J Plant Biochem and Biotech.*, 2023; 32: 467-477.
- 4) Ivanova V, Dörnyei A, Stefova M, Stafilov T, Vojnoski B, Kilár F, Márk L, Rapid MALDI-TOF-MS Detection of Anthocyanins in Wine and Grape Using Different Matrices. *Food Anal. Method*, 2011; 4: 108-115.

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

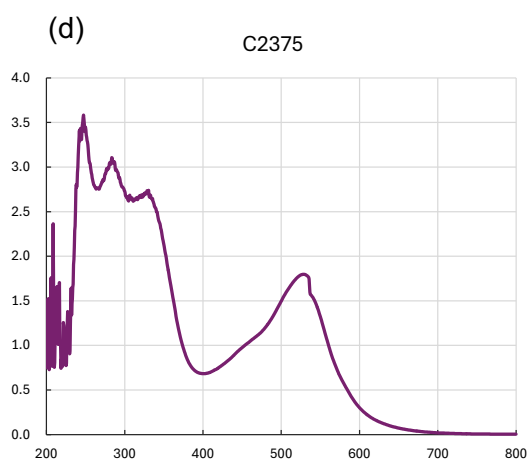
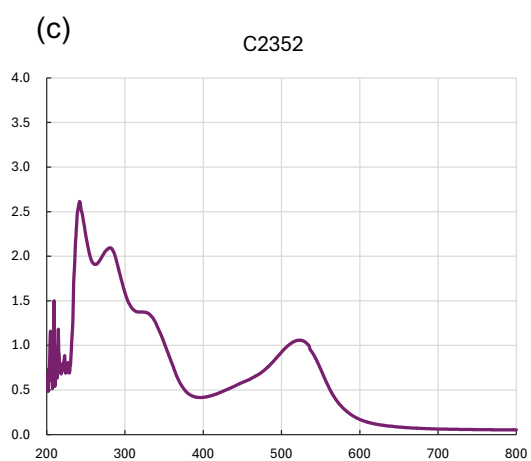
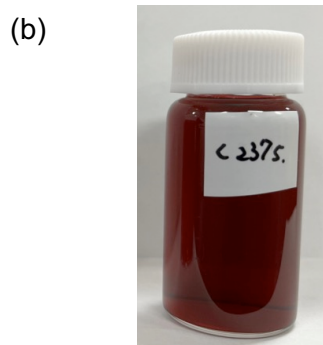


図 1. 色素原体の外観と検出波長の検討

(a)ロット 1 の外観, (b)ロット 2 の外観, (c)ロット 1 の吸光スペクトル, (d)ロット 2 の吸光スペクトル

いずれも pH 3.0 のクエン酸緩衝液中で観測

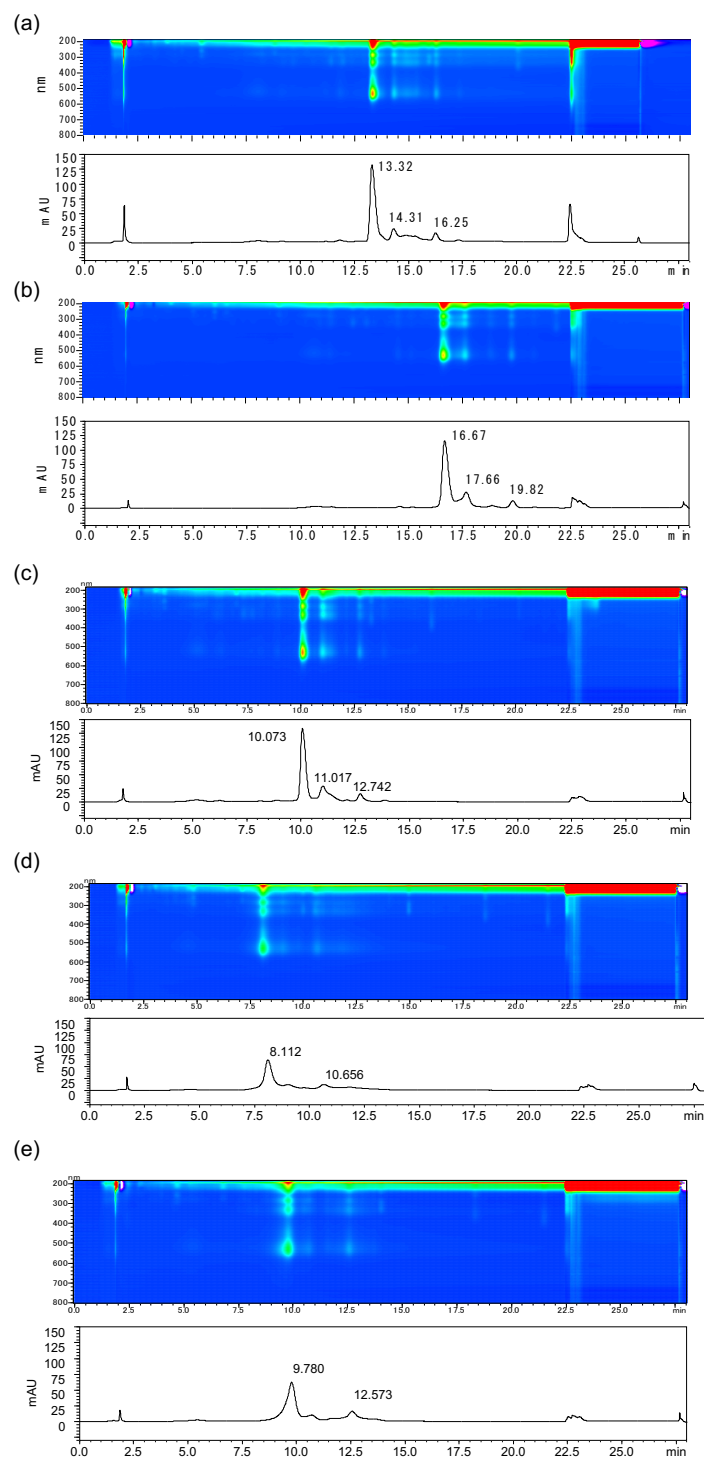


図 1. 分析カラムのスクリーニング結果

(a)TSKgel ODS-100Z column (4.6 × 150 mm, 5 μm, 東ソー社製), (b)TSKgel ODS-100V column (4.6 × 150 mm, 5 μm, 東ソー社製), (c)Xbridge C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm, Waters 社製), (d)YMC-PackPrp C18 RS column (4.6 × 150 mm, 5 μm, YMC 社製), (e)Inertsil ODS-2 column (4.6 × 150 mm, 5 μm, GL Sciences 社製)

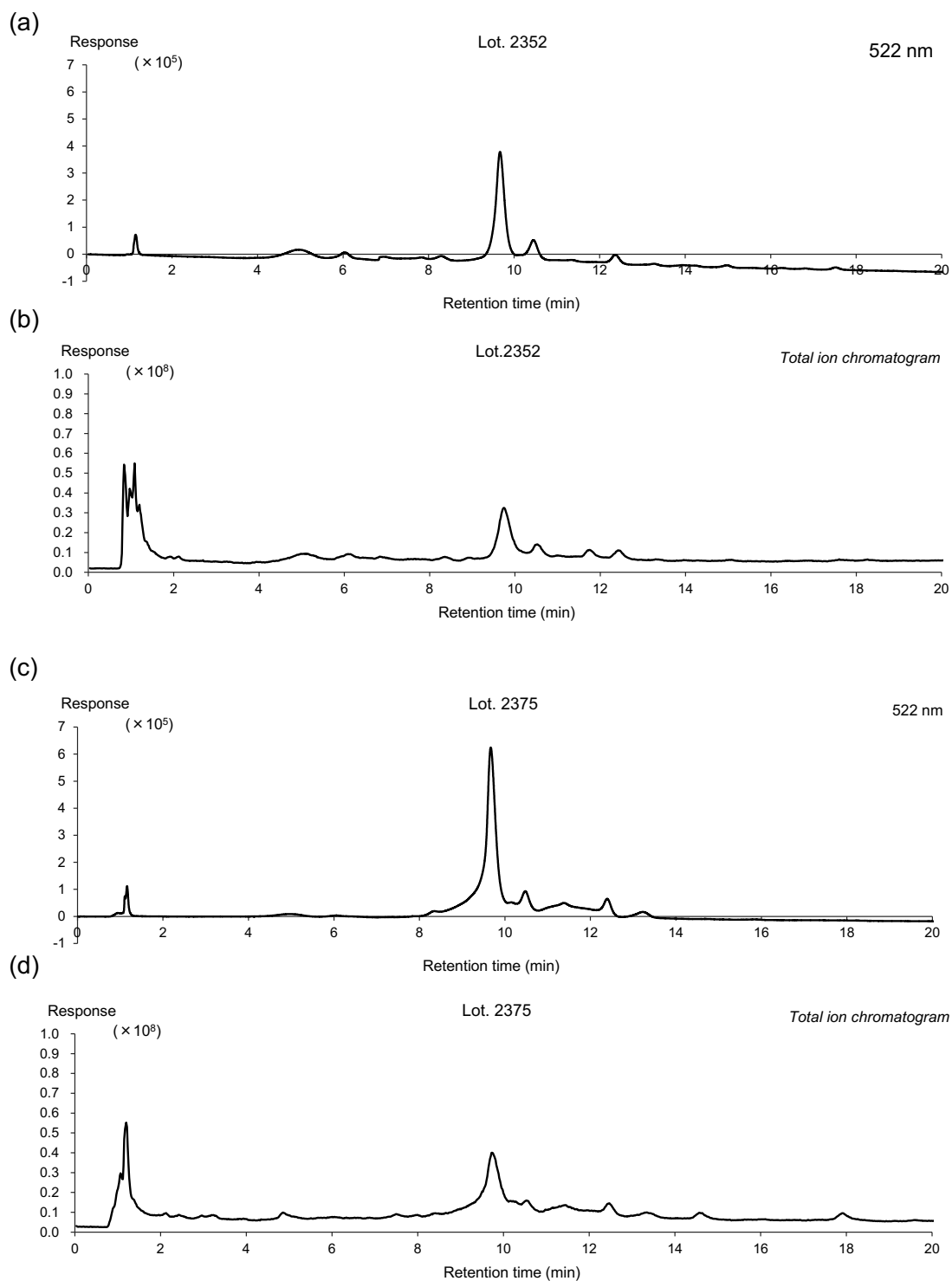


図 3. HPLC 及び LC-MS のクロマトグラム

(a)ロット 1 の HPLC クロマトグラム, (a)ロット 1 のトータルイオンクロマトグラム,
(a)ロット 2 の HPLC クロマトグラム, (a)ロット 2 のトータルイオンクロマトグラム

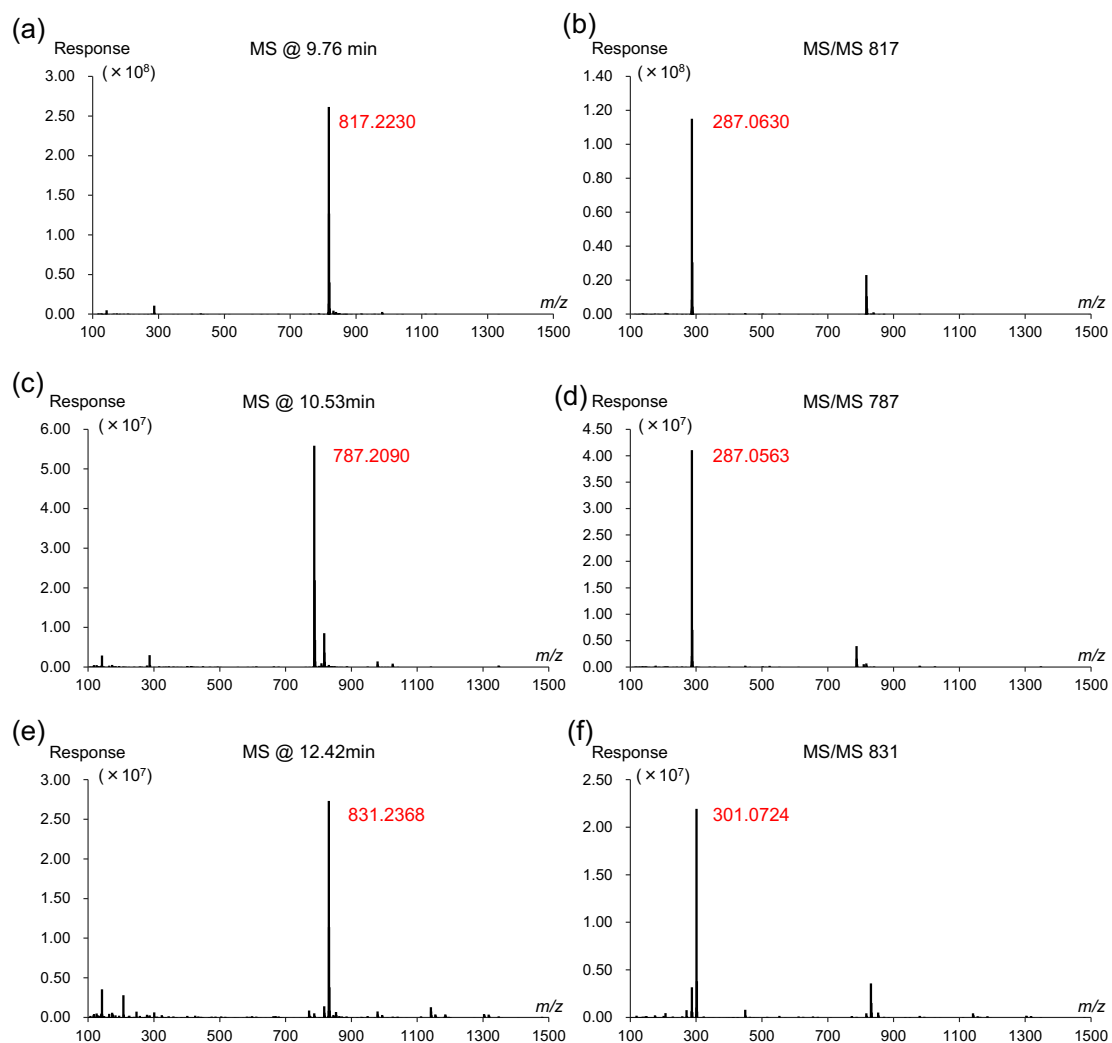


図 4. 各ピークの MS 及び MS/MS スペクトル

(a)9.76 分に検出されたピークの MS スペクトル, (b) m/z 817.2230 の MS/MS スペクトル, (c)10.53 分に検出されたピークの MS スペクトル, (d) m/z 787.2090 の MS/MS スペクトル, (e)12.42 分に検出されたピークの MS スペクトル, (f) m/z 831.2368 の MS/MS スペクトル

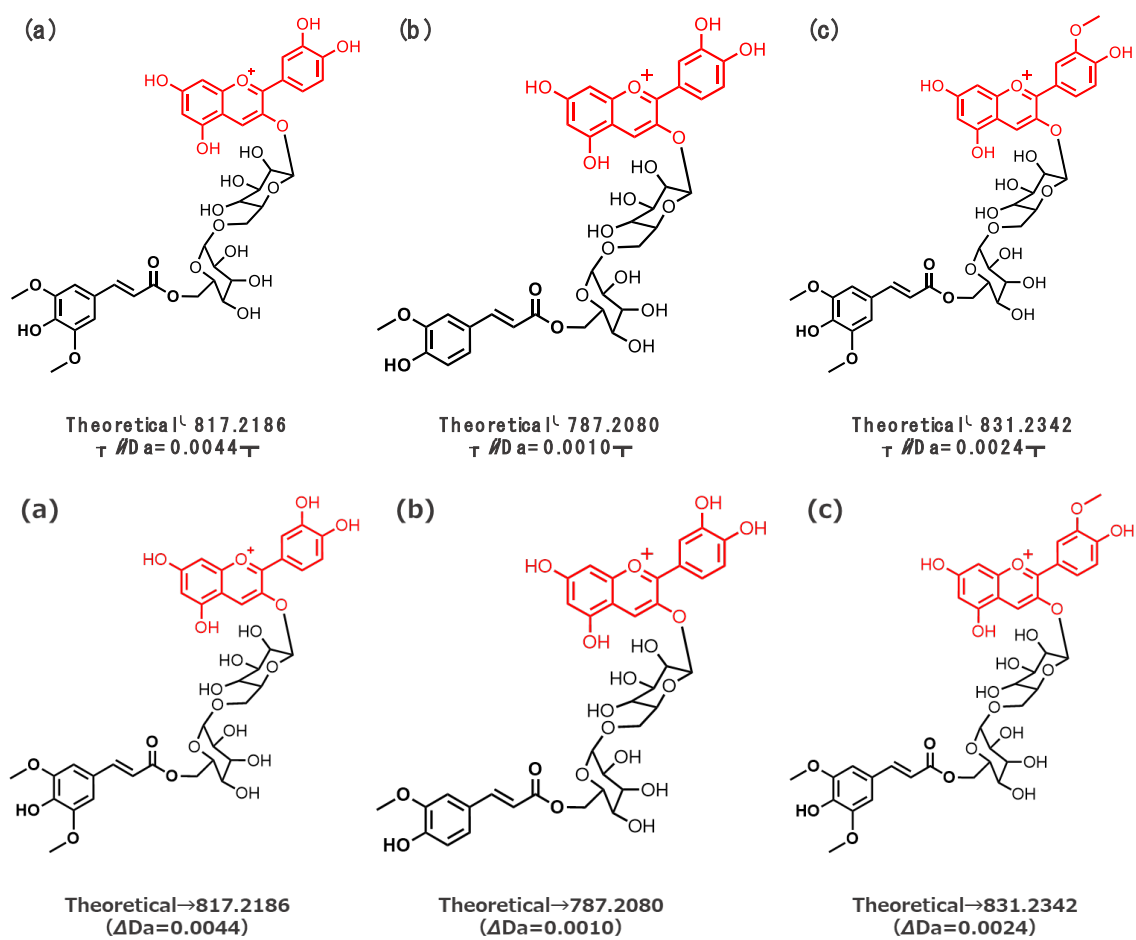


図 5. 推定される構造

(a) 9.76 分に検出されたピーク

(b) 10.53 分に検出されたピーク

(b) 12.42 分に検出されたピーク

表 1. 分配係数の検討結果

Two-phase solvents	Ratio	Partition coefficient(Ka)		
		Peak 1	Peak 2	Peak 3
	3.5/2.0/1.5/4.5/0.01	0.39±0.01	0.62±0.09	0.41±0.02
<i>tert</i> -Butyl methyl ether / <i>n</i> -Butanol / Acetonitrile / Water / Trifluoroacetic acid	3.0/2.5/1.5/4.5/0.01	0.62±0.03	0.75±0.03	0.64±0.04
	2.5/3.0/1.5/4.5/0.01	0.85±0.04	1.25±0.13	0.88±0.03
	2.0/3.5/1.5/4.5/0.01	1.24±0.01	2.09±0.10	1.36±0.06
	1.5/4.0/1.5/4.5/0.01	1.50±0.03	2.66±0.35	1.62±0.08

N=3 で実施，平均値±標準誤差で表記.