

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～ウコン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 ウコン色素は「第9版 食品添加物公定書」に記載されており、ウコン (*Crucuma longa* L.) の根茎から得られたクルクミンを主成分とするものであると定義されている。確認試験にはTLC、色価と極大吸収部の記述があるのみで、明確な成分は記載されていない。そこで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてウコン色素の主成分を明確にし、簡便かつ汎用性のある定量法を開発する必要がある。そこで、本研究では、分析対象物質の標準品を必要としない定量法「シングルリファレンス (SR) -HPLC定量法」を新たに構築した。高純度な主成分の入手法には高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いた。また、ウコン色素のSRにはクルクミンから合成デザインすることにより検出器の感度差や保持時間の影響を最小限にした。単離したクルクミノイドを、定量NMRに基づいた定量値を用いて相対モル感度 (RMS) を算出した。実際に、ウコン色素をSR-HPLC定量法で分析した結果、従来の絶対検量線法と同等の定量性を示し、SRの濃度や他社装置に変更しても再現性に影響しなかった。

研究協力者

高橋未来 立命館大学大学院薬学研究科
博士課程

A. 研究目的

ウコン色素は、「第9版 食品添加物公定書」(以下、公定書)において、ウコン (*Crucuma longa* L.) の根茎から得られたクルクミンを主成分とするものである。食用油脂を含むことがあると定義されている。¹⁾ ウコン色素は、抗炎症作用、抗酸化作用または抗がん作用などの様々な薬理作用があるため、クルクミノイドは注目されている機能性成分といえる²⁻⁴⁾。しかしながら、公定法におけるウコン色素の定量法では薄層クロマトグラフィーが規定されており、類似色素との区別が困難である。これまで、クルクミノイドの分析法として、高速薄層クロマトグラフィー (HPTLC)⁵⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁶⁻⁸⁾、質量分析 (MS)⁹⁻¹¹⁾ などが報告されている。しかしながら、クルクミノイド

の信頼性かつ高純度な標準品は高価格であるため、市販の標準品を入手することは容易ではない。先行研究において、ウコン色素にはクルクミン (CI)、デメトキシクルクミン (CII) およびビスデメトキシクルクミン (CIII) が主要成分であり、高速向流クロマトグラフィー (High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) により、これらクルクミノイドが単離精製されている (図1)¹²⁾。HSCCCは二相溶媒系を用いる液液分配を原理とした液体クロマトグラフィーであり、効率的かつ網羅的な単離精製法である。HSCCCは特殊な機器を用いるため、汎用性が乏しい。そこで、本研究では、HSCCCで得られたクルクミノイドに対する対応量標準品 (Single Reference, SR) に値付けした値 (相対モル感度, Relative Molar Sensitivity, RMS) を用いた SR-HPLC 定量法を開発することとした。ウコン色素からCI~CIIIを安価に獲得し、化学・物理的性質の類似性を考慮したSRを化学合成によりデザインする。そして、SRに基づいて

RMS を値付けすることにより、迅速かつ完全に定量値を求めることができる。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ウコン色素は、ターメリック色素（三栄源エフエフアイ社製、粉末）、クルクミン GS（ダイワ化成社製、液状）およびクルクミン S（保土谷化学工業社製、液状）を購入し、用いた。

n-ヘキサン、アセトニトリル、クロロホルム、メタノール、1,4-BTMSB-*d*₆、クルクミン標準品、ヨードメタン、アセトン、炭酸カリウムおよびギ酸（LC/MS 用、約 99%）は富士フイルム和光純薬社製を用いた。重アセトンはメルク社製を用いた。また、超純水は PURELAB flex5 system（ELGA 社製）を用いて得た。試料の希釈溶媒として、アセトニトリル/水（50/50, *V/V*）混液を用いた。

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
ロータリーエバポレーター：東京理化学器械社製 N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000
凍結乾燥機：東京理化学器械社製 FDU-1200

HPLC 装置：島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/RF-10AXL/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS，日立ハイテクサイエンス社 Chromaster 5160 / 5280 / 5310 / 5430，Waters 社製 Acquity UPLC H-Class

MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD

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

定量 NMR (¹H-qNMR) 装置：JEOL 社製 ECA600

B-3) LC 分離分析

先行研究より、ウコン色素はメタノールで溶解し、希釈溶媒を用いて調製した。移動相には、0.1vol% ギ酸水溶液（A）/0.1vol%ギ酸アセトニトリル（B）を使用し、A/B：50/50をアイソクラティック条件により、20分の分析を行った¹²⁾。カラム：TSKgel ODS-100V column（4.6×150 mm，5 μm，東ソー社製）
カラム温度：40℃
流速：1.0 mL/min
検出波長：405 nm
注入量：10 μL

B-4) HSCCC の分離分析

まず、三栄源エフエフアイ社製のウコン色素にメタノール 20 mL を加え、高速振とう（1,000 rpm，10 min）することにより抽出した。その後、遠心分離（10,000 rpm，10 分）し、上清を回収した。この操作を 2 回繰り返した。上清を濃縮乾固し、二相溶媒系の上層/下層（50/50, *V/V*）混液に溶解したものを注入試料とした。二相溶媒系は、ヘキサン/クロロホルム/メタノール/水溶液（5/10/7.5/2.5, *V/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。分取した試料は、島津製作所社製の HPLC を用いて確認し、最終的に獲得したクルクミノイドを凍結乾燥した。

B-5) クルクミノイドの SR 合成デザイン

クルクミン標準品 500 mg にヨードメタン 4.0mL を加え、テトラメチルクルクミンを合成した。触媒として、炭酸カリウム 500 mg，アセトン 15 mL を用いた。なお、合成した SR を島津製作所社製 HPLC と MS により同定および純度評価した。

B-7) ¹H-qNMR による単離したクルクミン類と SR の絶対定量

10 mg CI~CIII を重アセトン 1.0 mL に溶解した。また、10 mg SSR を重アセトン 2.0 mL に溶解した。1.0 mL 溶解液のうち 0.6 mL を NMR 管に移し、qNMR で外部標準法により定量した。

Data points : 60,000

Flip angle : 90°

Pulse delay : 60 s

Scans : 16 times

Probe : room temperature

Software : JEOL 社製 Purity Pro qNMR

ANALYSIS Software

B-8) クルクミン類の RMS 算出

qNMR 管中の CI~CIII および SR を、希釈溶媒により HPLC 標準溶液を調製した。qNMR の定量結果を用いて、絶対検量線の範囲は、0~100 μmol/L と設定し、RMS を求めた。まず、RMS を算出するとき、ランベルト・ベールの法則の式を下記のように式変形した。なお、吸光度 (R) は、吸光係数 (ε)、濃度 (C) および層長 (l) で表される。

$$R = \varepsilon \times C \times l$$

$$\frac{R_{analyte}}{(\varepsilon_{analyte} \times C_{analyte})} = \frac{R_{SR}}{(\varepsilon_{SR} \times C_{SR})}$$

$$\left(\frac{\varepsilon_{analyte}}{\varepsilon_{SR}}\right) \times C_{analyte} = \left(\frac{R_{analyte}}{R_{SR}}\right) \times C_{SR}$$

$$\frac{\varepsilon_{analyte}}{\varepsilon_{SR}} = \left(\frac{R_{analyte}}{R_{SR}}\right) \times \left(\frac{C_{SR}}{C_{analyte}}\right) = \text{RMS}$$

上記より、CI~CIII の RMS を、SR に対する CI~CIII の絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0 μmol/L のピーク面積は検量線の原点とした。また、今回の研究では、3 日間それぞれ RMS を算出し、再現性を確認した。

B-9) SR-HPLC 法を用いたウコン色素中のクル

クミン類の定量

RMS に基づいて 3 製品のウコン色素を SR-HPLC 法で定量し、従来の絶対検量線法による定量結果と比較した。クルクミン GS (ダイワ化成社製) およびクルクミン W (保土谷化学工業社製) は原液を希釈溶媒により調製した。また、ターメリック色素 (三栄源エフエフアイ社製) は試料 0.5 g をメタノール 10 mL で抽出し、希釈溶媒で調製した。なお、絶対検量線による定量は、qNMR 試料液を希釈溶媒により調製した。さらに、異なる HPLC 装置における SR-HPLC 定量法の再現性を検証するため、健康食品およびサプリメント (A~E) を用いて、島津製作所社製、Waters 社製および日立ハイテクサイエンス社製の HPLC 装置で CI~CIII を RMS に基づき定量した。

C. 結果及び考察

C-1) LC 分離分析

先行研究により、移動相は 0.1vol%ギ酸水溶液と 0.1vol%ギ酸アセトニトリルを用いて、最適な分析カラムを検討した¹²⁾。使用したカラムは東ソー社製 TSKgel ODS-80Ts および TSKgel ODS-100V カラムであり、どのカラムサイズも内径 4.6×長さ 150 mm、粒子径は 5 μm であった。HPLC クロマトグラムピーク形状や分離度を比較した結果、TSKgel ODS-100V を採用することとした (図 2)。

C-2) HSCCC の単離分析

二相溶媒系ヘキサン/クロロホルム/メタノール/水溶液 (5/10/7.5/2.5, V/V/V/V) を用いて、メタノール抽出したウコン色素を HSCCC で単離精製した。図 3 にウコン色素の HSCCC クロマトグラムを示した。その結果、固定相における上層の保持率は 50%であり、3 つの主要なピークが確認された (Fraction 2~4)。なお、分析時間は 450 分であった。これら分取物の MS スペクトルでは、いずれもクルクミノイドの [M-H]⁻ (Fraction 2 : m/z 367, Fraction 3 : m/z 337, Fraction 4 : m/z 307) が観察された (図 4)。さらに、HPLC

で測定した結果、いずれも単一ピークであった(図5)。また、Fraction 1およびHSCCCカラム内の固定相のHPLCクロマトグラムを図6に示した。その結果、どちらにもCI~CIIIがほとんど残っていないことが確認された。以上より、ウコン色素(15.5 g)からCIは146.6 mg(収率:0.94%)、CIIは98.3 mg(収率:0.64%)およびCIIIは141.7 mg(収率:0.91%)を入手することができた。

C-4) クルクミン類のSR合成デザイン

分析対象物質の最適なSRの条件は、分析対象物質に類似した吸収極大波長を持つこと、物理的に安定であること、分析対象物質と十分なLC分離が可能であること、高純度および安価であることである。そこで、本研究では、比較的安価に入手可能であるCIを用いて、SRの合成デザイン(アルキル化)を検討した(図7)。生成物をMSやNMRを用いて同定した結果、テトラメチルクルクミンであった(図8)。このSRをウコン色素に添加してHPLCで測定すると、CI~CIIIと良好な分離で検出された(図9)。以上より、本研究で合成デザインされたSRは、RMSを用いたクルクミノイドのHPLC定量法に適応可能であると考えた。

C-5) ¹H-qNMRによる単離したクルクミン類とSRの絶対定量

本研究では、qNMR用標準物質として、1,4-BTMSB-*d*₄を用いた。1,4-BTMSB-*d*₄の純度(99.8%)に基づいて、単離したCI~CIIIとSRをqNMRにより定量した。それらのqNMRスペクトルを図10に示した。その結果、CIは21.5 mmol/L、CIIは25.6 mmol/L、CIIIは20.3 mmol/LおよびSRは19.1 mmol/Lであった。

C-6) クルクミン類のRMS算出

単離したCI~CIIIとSRのNMR管の試料溶液を用いて、HPLC用標準溶液を調製し、絶対検量線を作成し(原点通過, 0~100 μmol/L), 図11に示した。さらに、検量線の様々な濃度幅

においてRMSを3日間連続で検量線を作成することによりRMS算出した。CI~CIIIのRMSの平均値±RSD%を求めた結果、CIは8.9±1.2、CIIは9.6±0.9およびCIIIは8.9±2.0であった。以上より、本研究では、検量線の濃度幅や日間の影響を受けずに、高精度かつ堅固なRMSを算出することができたといえる。

C-7) SR-HPLC法を用いたウコン色素中のクルクミン類の定量

算出したCI~CIIIのクルクミノイドのRMSに基づいて、各メーカーのウコン色素をSR-HPLC定量法で分析した。なお、添加するSR濃度は、25 μmol/L、50 μmol/Lおよび100 μmol/Lとした。そのときのHPLCクロマトグラムを図12に示した。その結果、今回の研究で合成デザインしたSRはウコン色素中の成分に影響なくピークを検出することができた。そして、各SR濃度におけるCI~CIIIの定量値を表1にまとめた。なお、CI~CIIIのqNMR試料液を用いて、絶対検量線法による定量値も算出した。その結果、どのウコン色素においても、従来の絶対検量線と同等の定量値を示した。さらに、健康食品およびサプリメント(A~E)を島津製作所社製、Waters社製および日立ハイテクサイエンス社製のHPLC装置でSR-HPLC定量分析を行った。各HPLC装置の健康食品およびサプリメントのHPLCクロマトグラムを図13~15に示し、定量結果を図16にまとめた。その結果、島津製作所社製のHPLC装置でRMSを算出した場合、他社のHPLC装置においても、本手法は適応可能であると考えられた。

D. 結論

本研究では、既存添加物ウコン色素に含まれるCI~CIIIのSR-HPLC定量法を構築した。まず、標準品が入手困難であるCI~CIIIをHSCCCにより単離精製した結果、それぞれ高純度な単一成分を得ることができた。そして、qNMRにより絶対定量を行い、その定量値に基づいて検量線を作成した結果、再現性の保証されたRMSを

算出できた。それらの RMS を用いて流通しているウコン色素中の CI~CIII を定量した結果、絶対検量線法とほぼ同じ定量値を示し、他社の HPLC 装置で定量を実施しても大きな誤差は確認されなかった。以上より、本分析法を用いることにより、ウコン色素中の主成分を迅速かつ簡便に定量可能であり、その値は堅固かつ信頼性のあるといえる。今後は、様々な条件下（研究室間、日間、カラムなど）における定量値の再現性を確認することが必要であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省(2017).
- 2) Ramsewak R. S, Dewitt D. L, Nair M. G.: Cytotoxicity antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumin 1-3 from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, **2000**; 7: 303-308.
- 3) Menon V. P, Sudheer A. R: Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2007**; 595: 105-125.
- 4) Maheshwari R. K, Singh A. K, Gaddipati J, Srimal R. C: Multiple biological activities of curcumin. *Life Sci.*, **2006**; 78: 2081-2087.
- 5) Ansari M. J, Ahmad S, Kohli K, Ali J, Khar R. K: Stability indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**; 39: 132-138.
- 6) Jayaprakasha G. K, Jagan Mohan Rao L, Sakariah K. K: Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**; 50: 3668-3672.
- 7) Heath D. D, Pruitt M. A, Brenner D. E, Rock C. L: Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography, **2003**; 783: 287-295.
- 8) Gonza'lez M, Gallego M, Valca'rcel M: Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid-phase extraction system. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**; 51: 2121-2129.
- 9) Inoue K, Hamasaki S, Yoshimura Y, Yamada M, Nakamura M, Ito Y, Nakazawa H: Validation of LC/electrospray-MS for determination of major curcuminoids in foods. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2003**; 26: 53-62.
- 10) Liu A, Lou H, Zhao, L, Fan P: Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**; 40: 720-727.
- 11) Jiang H, Somogyi A, Jacobsen N. E, Timmermann B. N, Gang D. R: Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**; 20: 1001-1012.
- 12) Inoue K, Nomura C, Ito S, Nagatsu M, Hino T, Oka H: Purification of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin by High-Speed Countercurrent chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**; 56: 9328-9336.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 高橋未来, 高木映里, 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HPLCによるクルクミン類の定量法の検討. 第2回日本定量NMR研究会 (2020.12.4)(川崎市)
- 2) Takahashi M.: Single Reference HPLC Approach for Application of Food Analysis. AOAC 2021 Virtual Midyear Meeting (2021.3.19) (Online)

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Takahashi M, Nishizaki Y, Maruyama T, Sugimoto N, Kyoko S, Inoue K: Quantification of tea - derived catechins without the requirement

for respective calibration curves by single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *J. Sci. Food Agric.*, **2020** DOI 10.1002/jsfa.11013

2-2. 総説

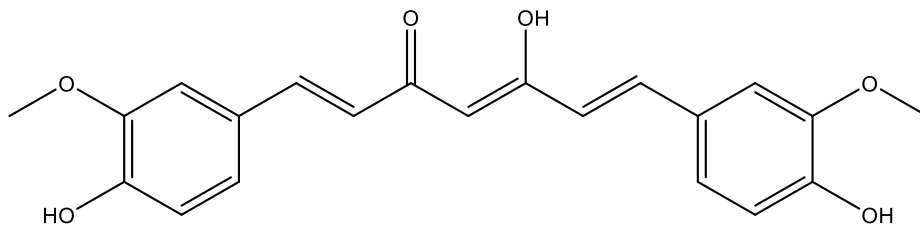
なし

2-3. 単行本

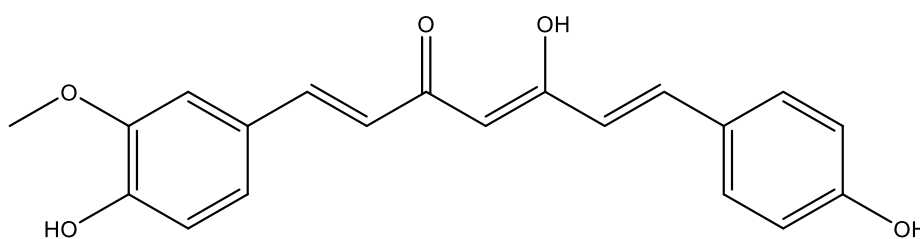
なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況

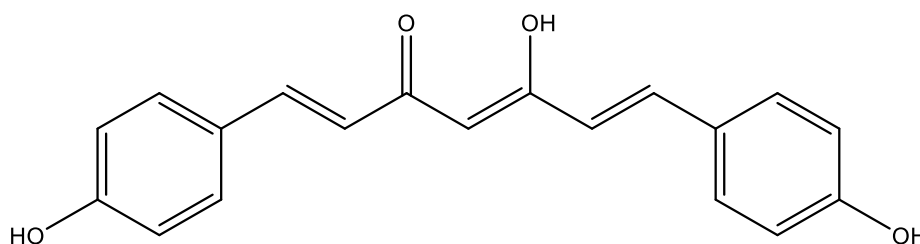
なし



クルクミン (CI)



デメトキシクルクミン (CII)



ビスデメトキシクルクミン (CIII)

図1 クルクミノイドの化学構造式

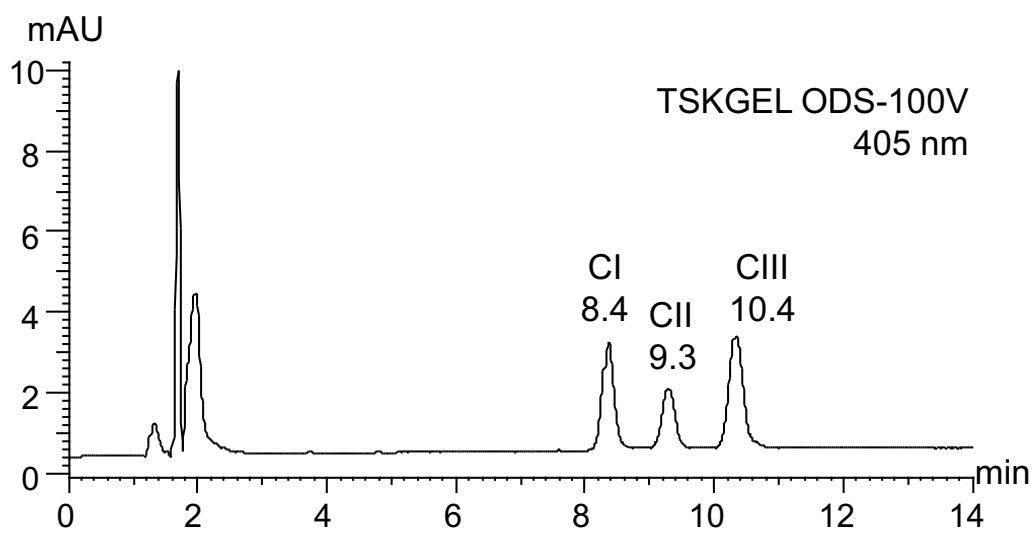
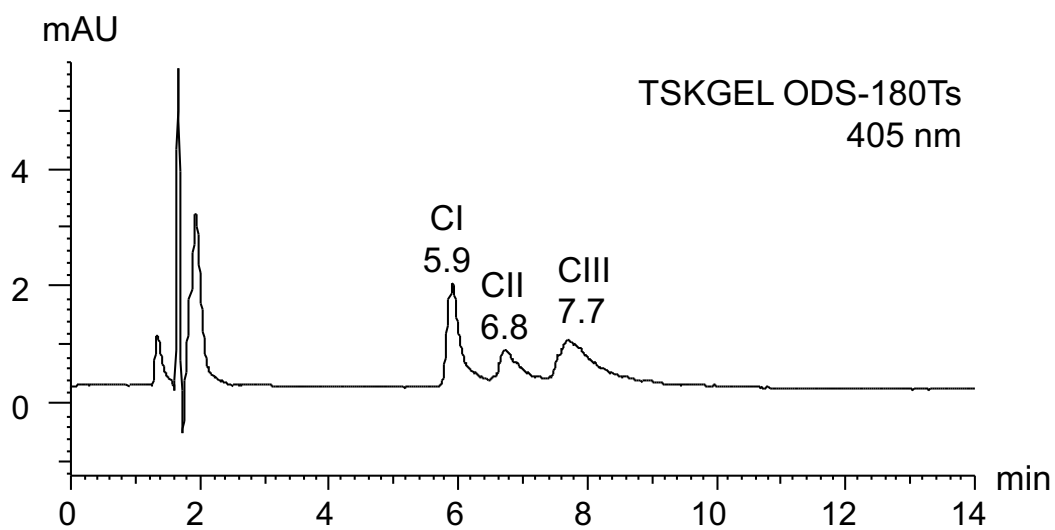


図 2 TSKgel ODS-80Ts および TSKgel ODS-100V における
ウコン色素の HPLC クロマトグラム

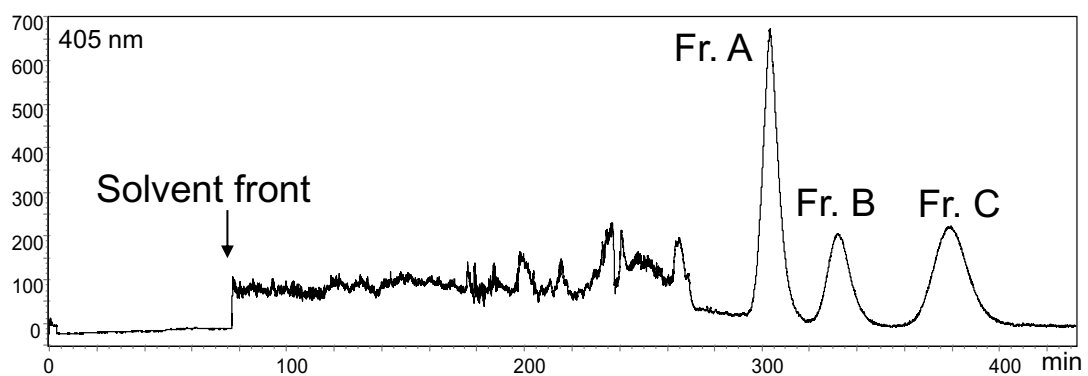


図3 ウコン色素の HSCCC クロマトグラム

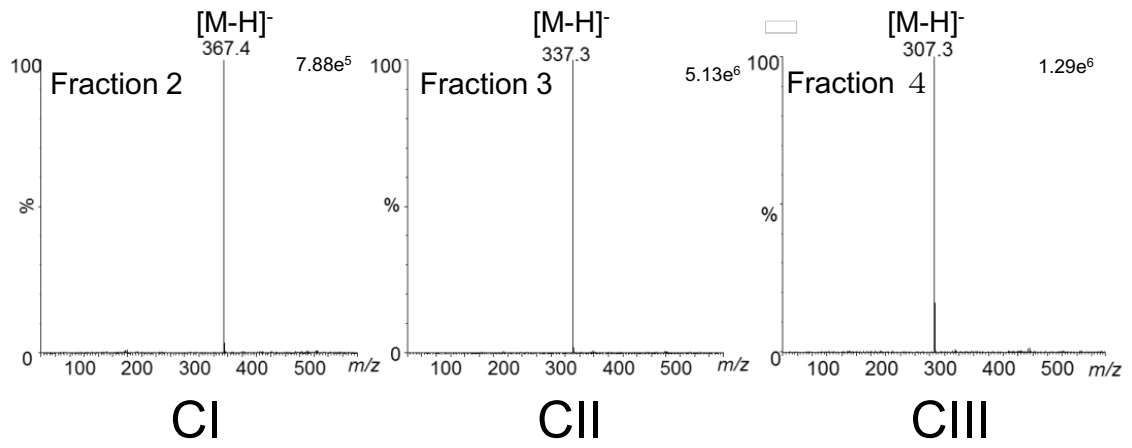


図 4 Fraction 2~4 の MS スペクトル

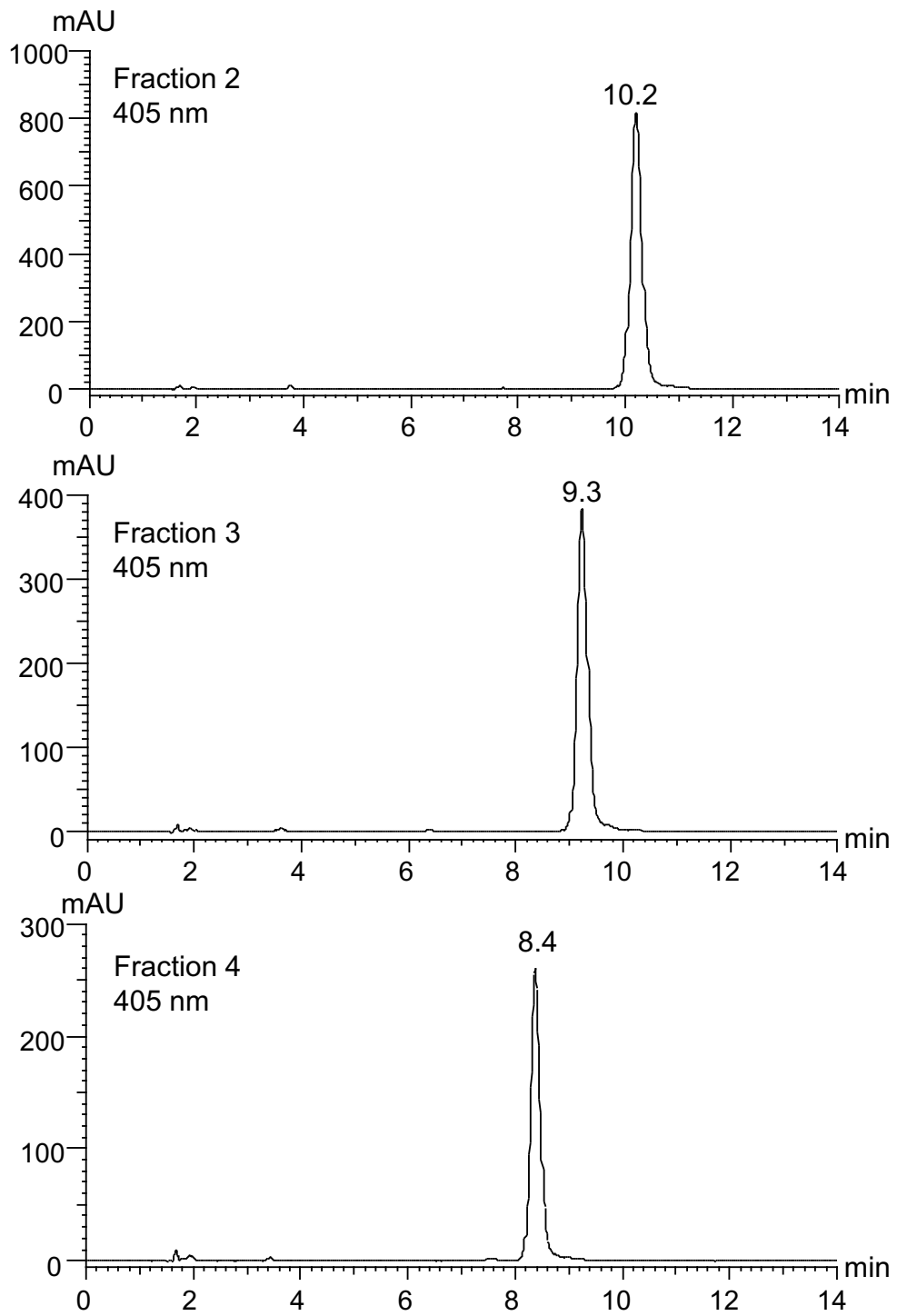


図 5 Fraction 2~4 の HPLC クロマトグラム

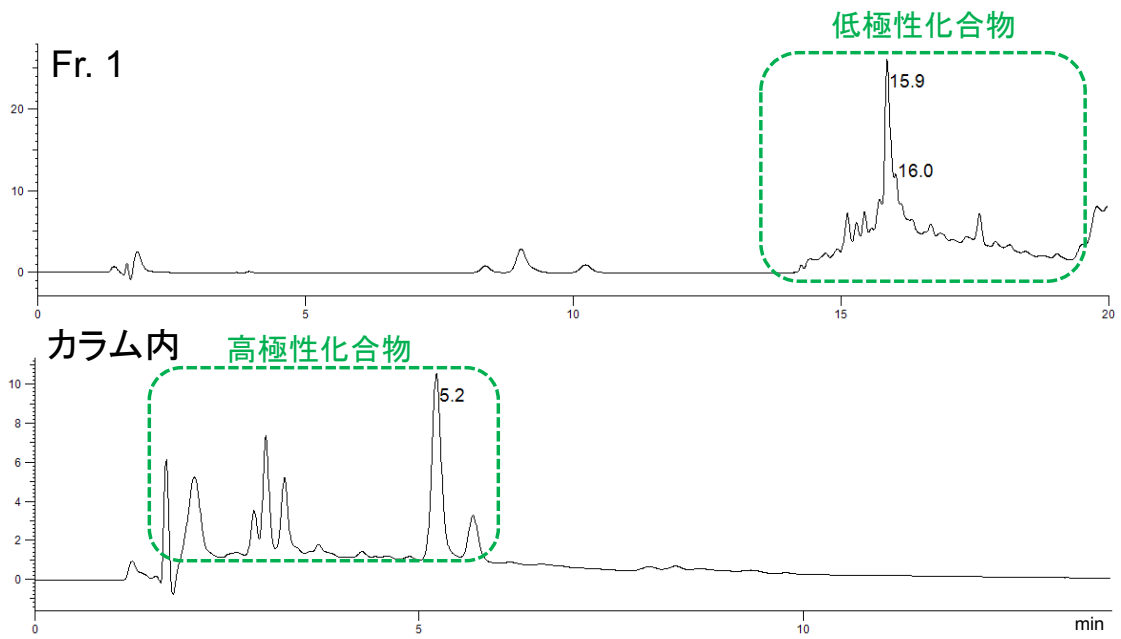


図 6 Fraction 1 およびカラム内（固定相）溶媒の HPLC クロマトグラム

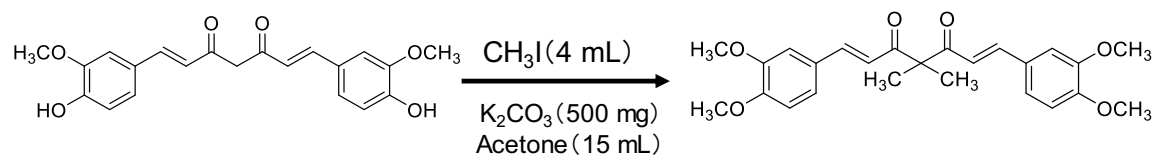


図 7 SR の合成デザインにおける化学反応式

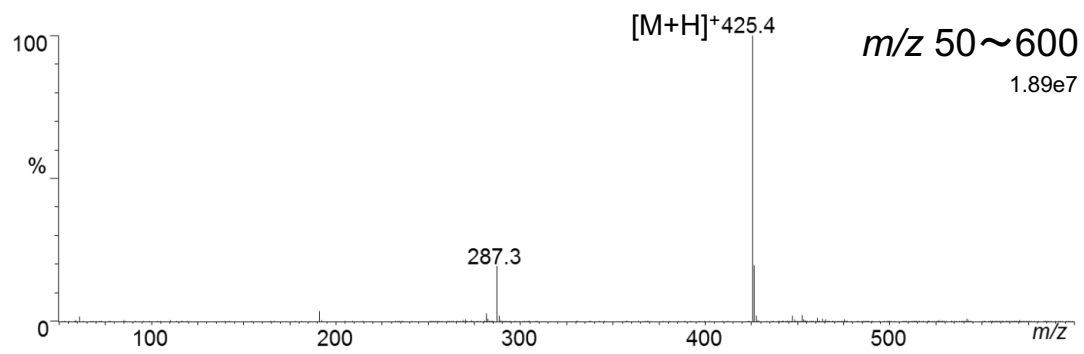


図 8 合成デザインした SR の MS スペクトル

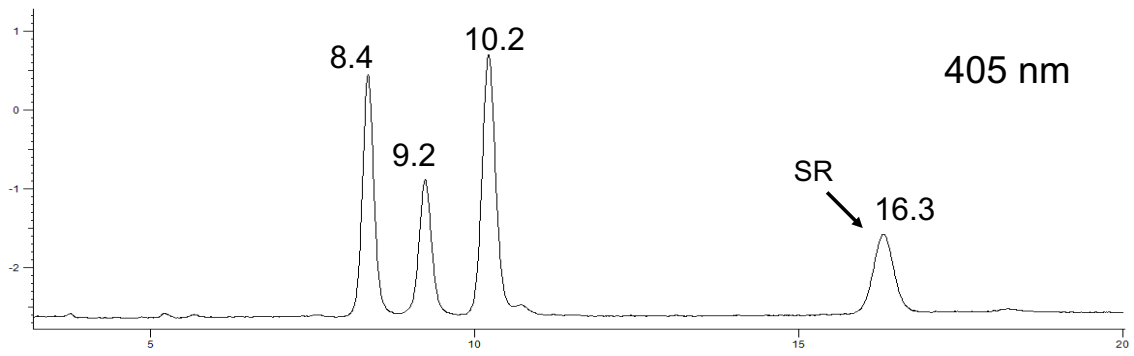
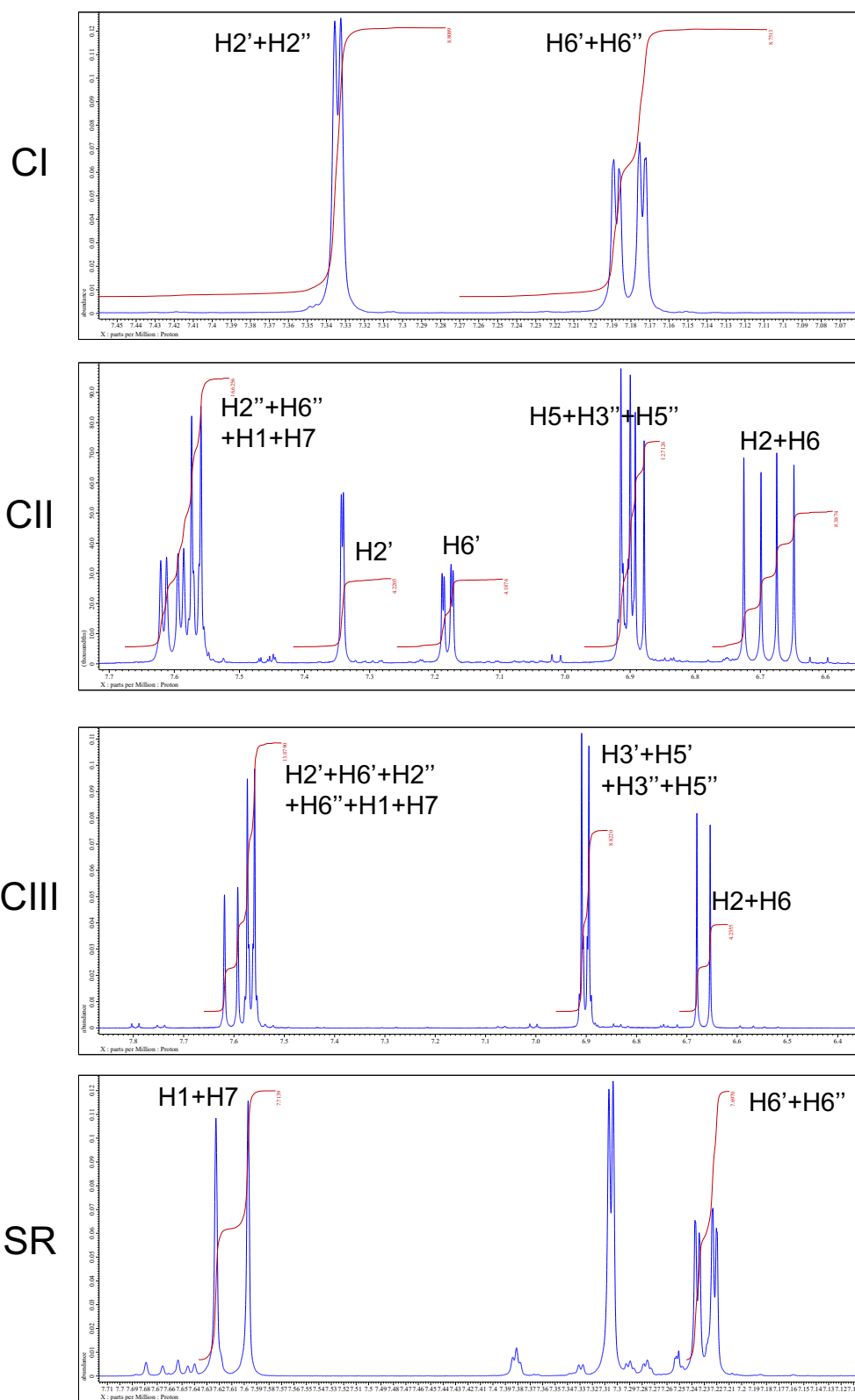


図9 合成デザインした SR の HPLC クロマトグラム



☒ 10 HSCCC で単離した CI~CIII および SR の qNMR スペクトル

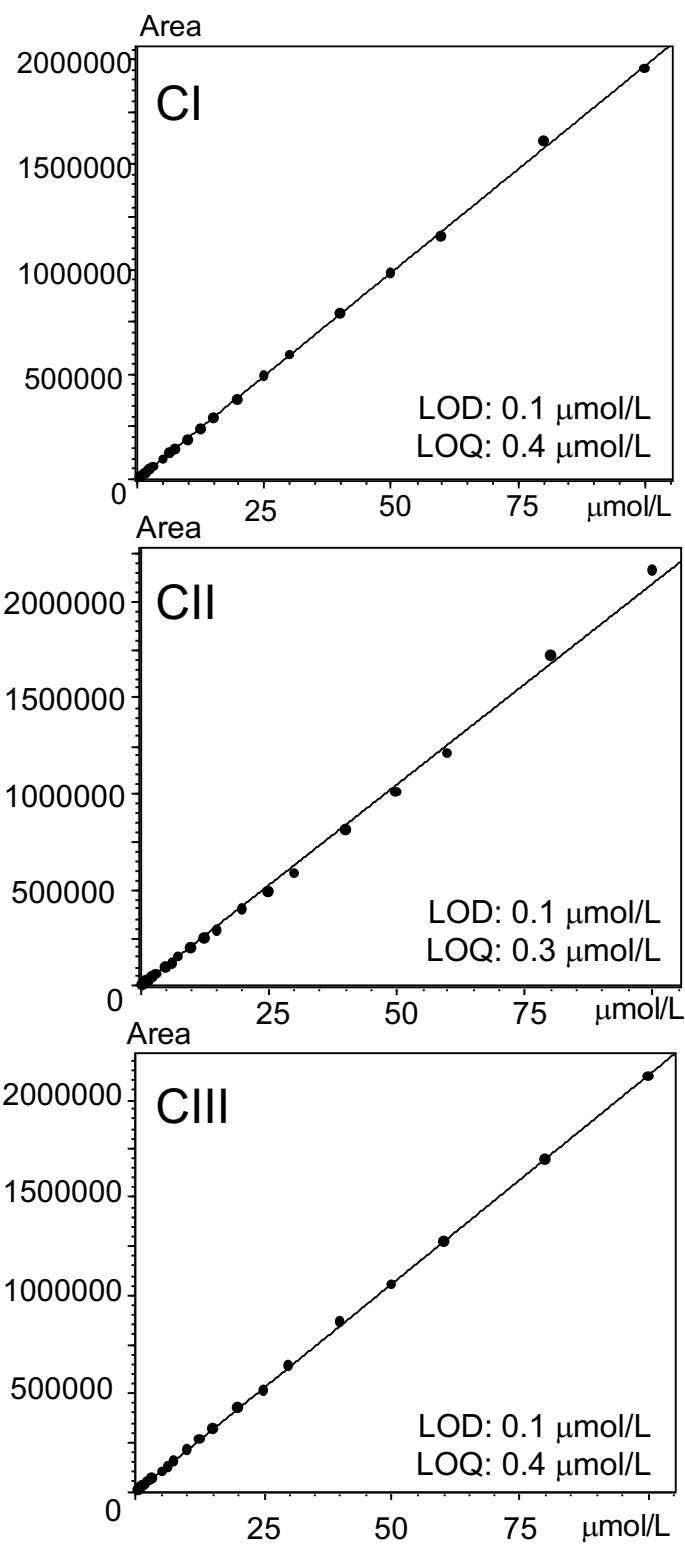


図 11 CI~CIII の絶対検量線 (LOQ~100 $\mu\text{mol/L}$)

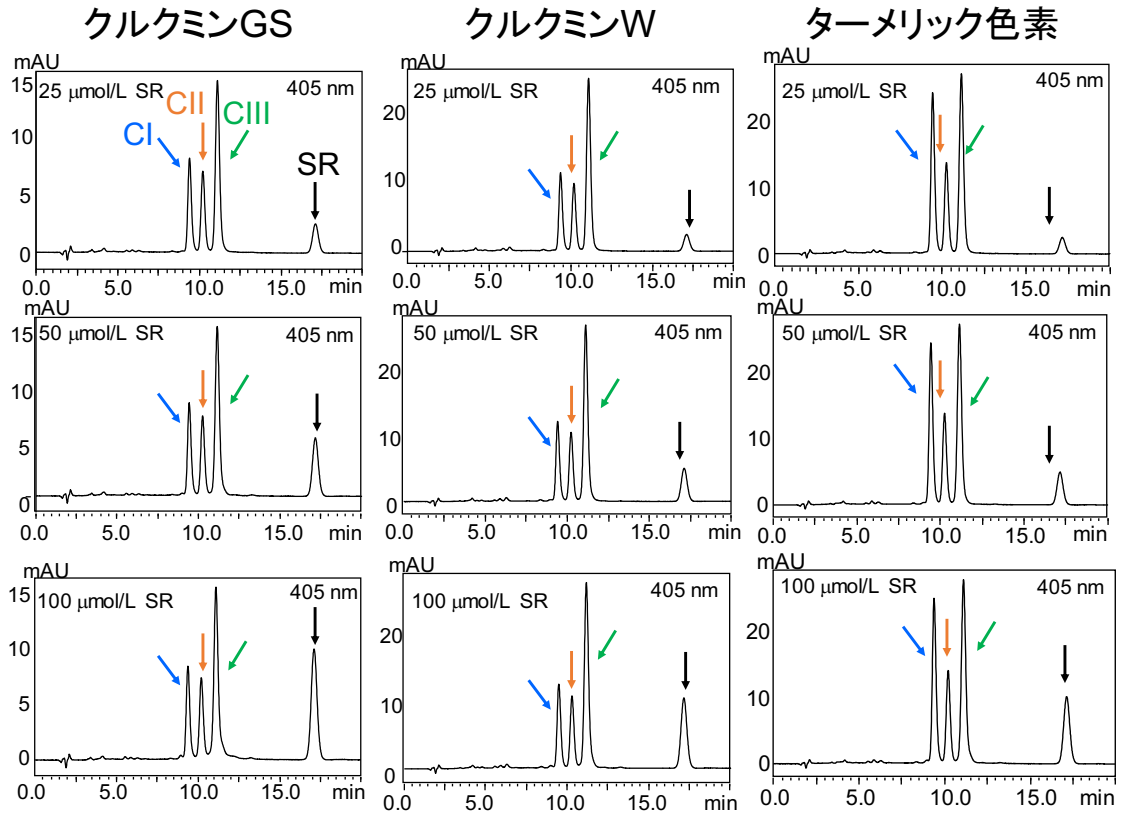


図 12 SR を添加したウコン色素製品の HPLC クロマトグラム

表 1 SR-HPLC 定量法および絶対検量線法による
ウコン色素製品中の CI~CIII の定量結果

		クルクミンGS			クルクミンW			ターメリック色素		
		CI	CII	CIII	CI	CII	CIII	CI	CII	CIII
SR μmol/L	25	11.9±0.7	5.1±0.7	5.2±0.7	20.8±1.2	7.5±1.9	7.6±2.0	22.0±0.2	10.3±0.3	16.0±0.4
	50	11.9±0.3	5.1±0.4	5.2±0.2	21.4±0.1	7.7±0.2	7.8±0.4	22.2±0.2	10.3±0.2	16.0±0.2
	100	13.0±1.2	5.3±1.0	5.4±0.2	21.6±0.2	7.5±0.3	7.7±0.2	22.2±0.2	10.1±0.2	15.7±0.2
絶対検量線法		12.3±0.2	5.2±0.4	5.2±0.6	21.7±0.1	7.5±0.4	7.4±0.3	22.4±0.4	10.2±0.3	15.2±0.1

n=3

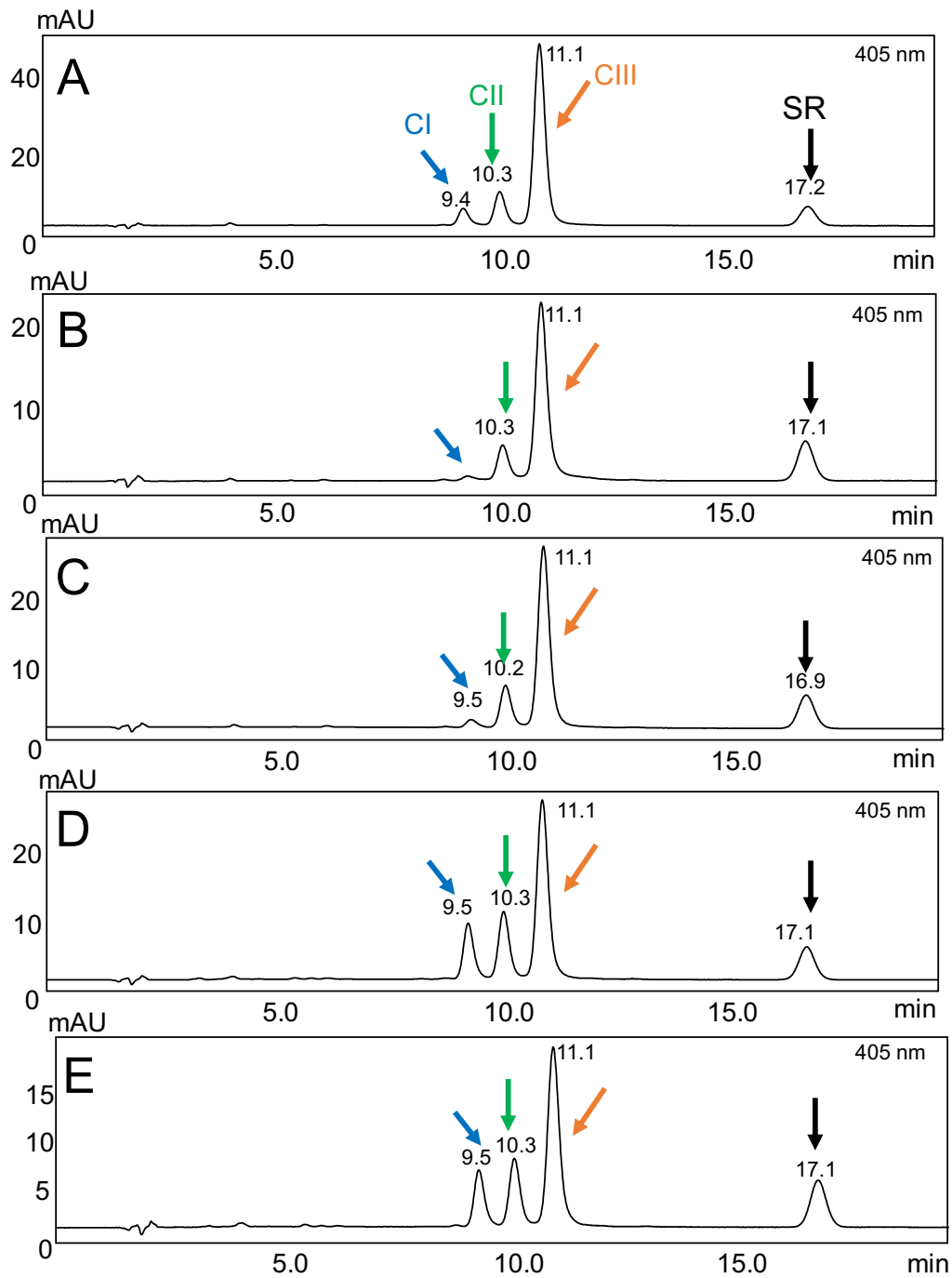


図 13 SR を添加したウコン関連の健康食品およびサプリメントの HPLC クロマトグラム (島津社製 HPLC 装置)

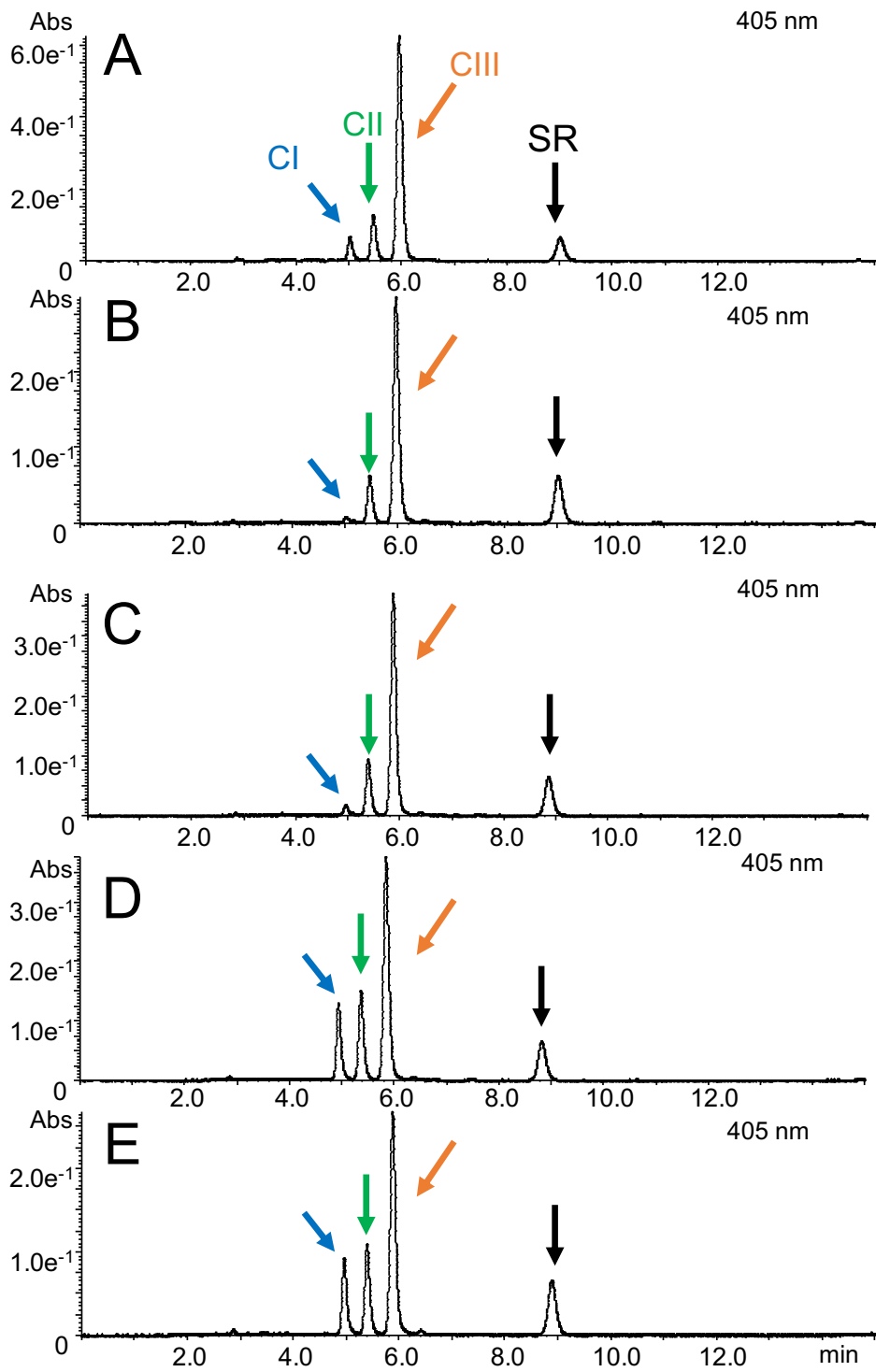


図 14 SR を添加したウコン関連の健康食品およびサプリメントの HPLC クロマトグラム (Water 社製 HPLC 装置)

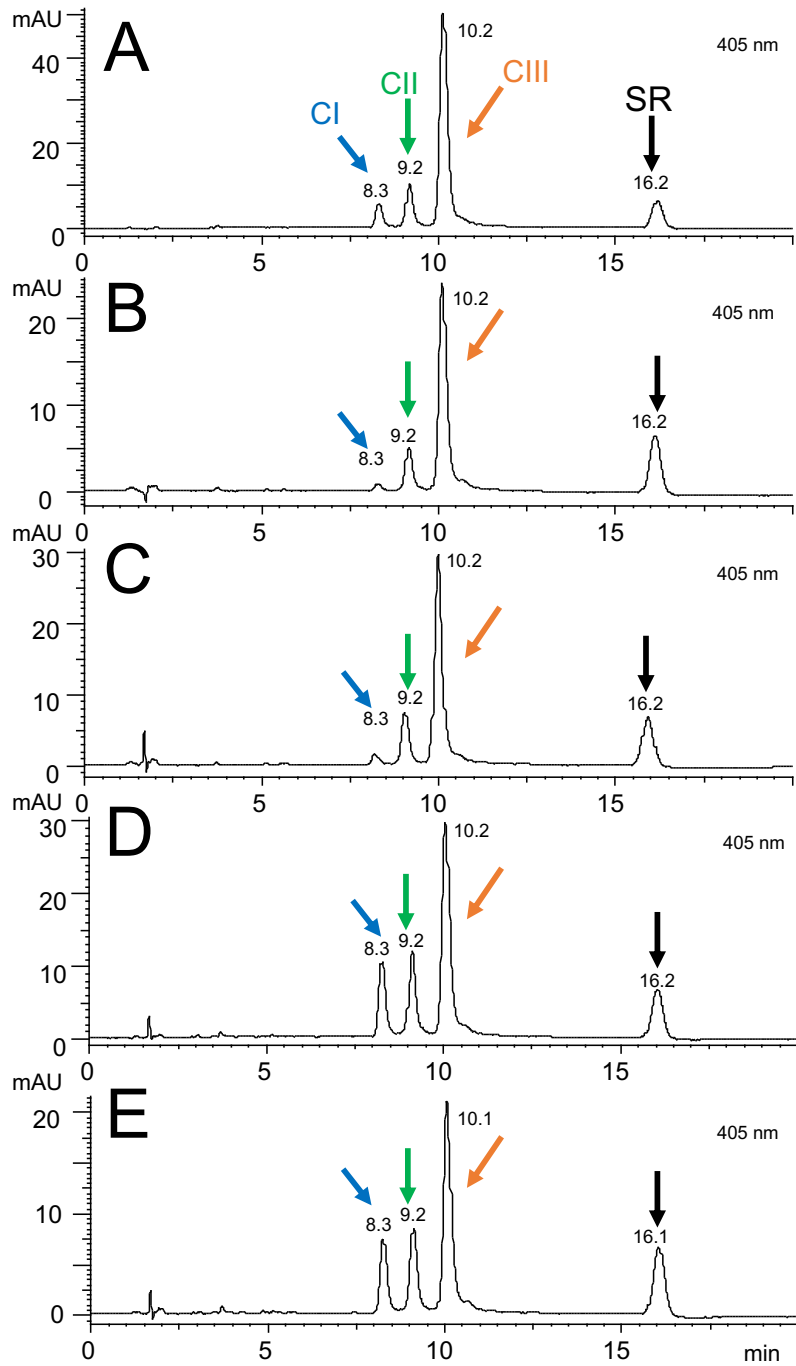


図 15 SR を添加したウコン関連の健康食品および
 サプリメントの HPLC クロマトグラム (日立ハイテクサイエンス社製 HPLC 装置)

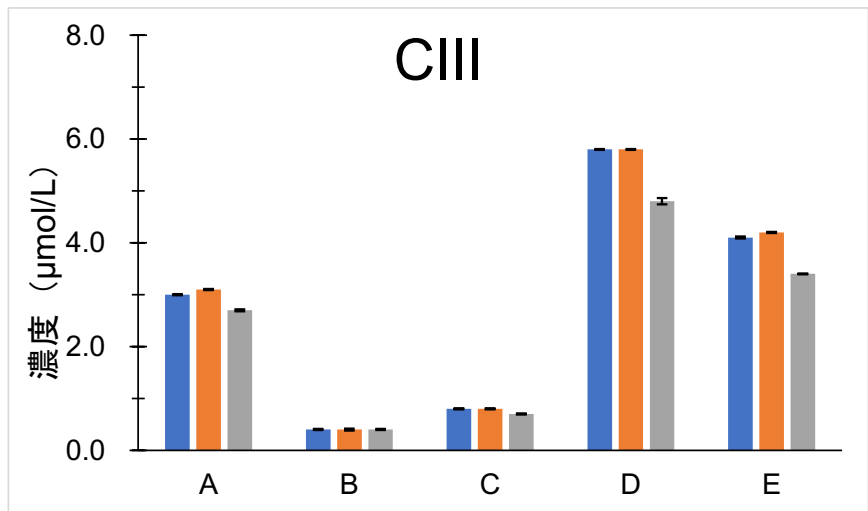
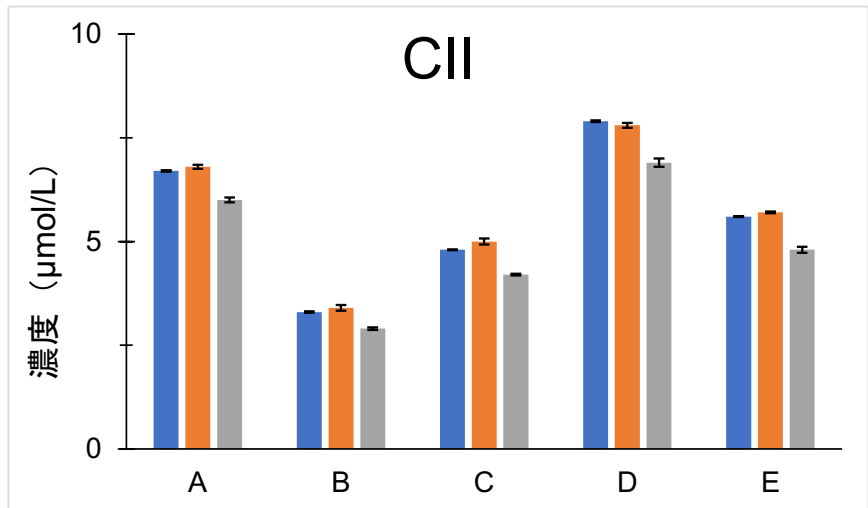
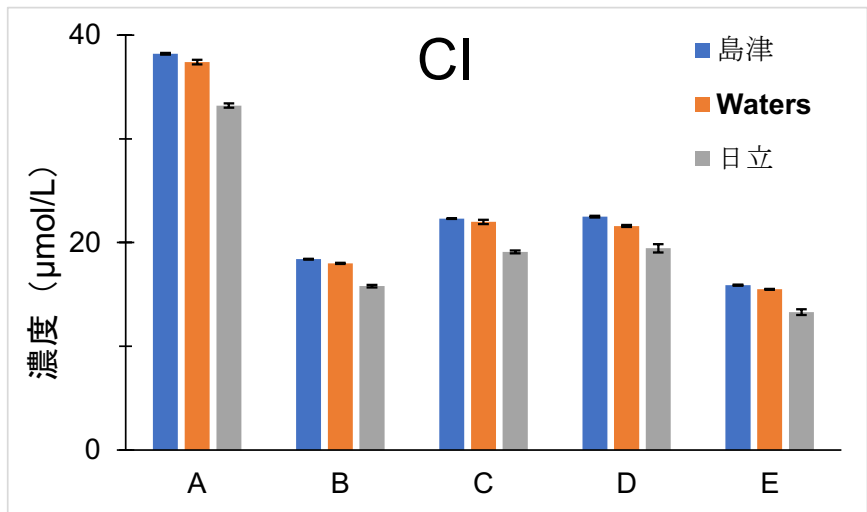


図 16 各メーカーの HPLC 装置における SR-HPLC 定量法を用いたウコン関連製品中の CI~CIII 定量結果