

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7年度 研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

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、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、現段階での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。昨年度の研究において、ムラサキヤマイモ色素に含まれるアントシアニンのプロファイリングを高速液体クロマトグラフィー-質量分析計を用いて行った。結果、3種の相対的に高強度なピークが認められ、これらのアグリコン及び配糖体を決定できた。一方で、その糖の結合様式に関しては決定するには至らず、定性能の高い測定による追加解析の必要が考えられた。今年度の検討では、この追加解析に向け高純度の成分を獲得するべく、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いて単離精製することを目指した。昨年度に決定した、分配係数が1周辺を得られる溶媒条件において、75 mLカラムでのHSCCCによる単離が確認できた。さらに、350 mLカラムでのHSCCCによる本精製を行った。

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(基原植物が異なる)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、現在、正式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、定性及び定量法について基礎検討を実施する必要がある。

そこで本研究では、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。定量分析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。昨年度の検討では、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、これらはシアニジンあるいはペオニジンをアグリコンとする配糖体であることが明らかとなった。また、これらのピークに対し

て高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いた標準品の獲得を行うべく、分配係数の算出を通じて最適溶媒条件を設定した。

今年度の研究では、設定した最適溶媒条件にて、CAG の単離精製を実施した。まず初めに、HSCCC の成立を確認するために、小カラム (75 mL 容) での小規模な単離を実施した。分離が確認されたため、続いて大カラム (350 mL 容) を用いて本精製を実施した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ムラサキヤマモ色素の原体 1 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：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、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、本研究に用いた。

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：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

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-PREP H 型

ポンプ：PU 714M pump (GL Sciences 社製)

コントローラー：SC 762 system controller (GL Sciences 社製)

UV-vis 検出器：UV 702 (GL Sciences 社製)

フラクションコレクター：PLC 761 fraction collector (GL Sciences 社製)

HPLC-HRMS 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 G2 XS

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) 測定対象の原体あるいは精製後溶液の調製

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。HSCCC の単離精製品については 5 mL を分取し遠心エバポレーターにより濃縮後、1 mL の移動相初期粗製溶媒にて再溶解し、測定試料とした。

B-4) 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：TSKgel ODS-100Z column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, 東ソー社製)

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 $\times$ 150 mm, 3 μ m, 東ソー社製)を用いた。

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

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 μ L

B-5) HSCCC による単離精製

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たものを用いた。溶媒の混合比率は次の通りとした：*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/水/トリフルオロ酢酸 = 2.25/3.25/1.5/4.5/0.01 (V/V/V/V)。合計量で 2 L 分調製し、2 時間静置することで完全に分配させた。回転数 1000 rpm、検出波長 530 nm、流速を 2 mL/min あるいは 4.0 mL/min として、HSCCC を実施した。小カラム (75 mL 容) での検討には 0.1 mg/mL に調製した色素原体の再溶解溶液を用い、4 mL 注入した。大カラム (350 mL 容) での本精製には 2 mg/mL に調製した色素原体の再溶解溶液を用い、4 mL 注入した。

C. 結果及び考察

C-1) 小カラムを用いた単離精製の確認

まず、最適化した溶媒系において、HSCCC による分離が可能なのかを確認する目的で、小カラムを用いた予備検討を実施した。本溶媒系における HSCCC への固定相保持率は 20%であった。図 1 に原体の HPLC 測定結果を示す。また、図 2 には HSCCC クロマトグラムを示す。530 nm の検出波長において、4 つのピークを取得することが出来た。これらを分取し、HPLC により分析した結果を図 3-(a)~(d) に示す。フラクション No. 3 には主成分と考えられるピーク 1 が溶出した。一方でフラクション No. 1 及び 2 にはピーク 1 よりも遅く溶出する成分が認められた。このことは、HSCCC による分離は、必ずしも逆相 HPLC と同様の溶出傾向をとるわけではないことを示唆した。フラクション No. 4 にはピーク 1 よりも HPLC 溶出の遅いピーク 2 と考えられる成分が検出された。一方で、原体に認められた副成分ピーク 3 は、これらのフラクションには含まれておらず、固定相への残存が考

えられた。続いて、獲得量を増加するために大カラムを用いた単離精製に関して検討を行った。

C-2) CAG 標準品の本精製

C-1 の検討結果から本系において、効率的な単離精製が可能と考えられたため、続いて大カラムを用いた単離精製を実施した。本条件における固定相保持率は 67%であった。注入溶液の濃度を 20 倍とし、カラムサイズを変更して同条件で HSCCC を実施した結果、顕著なピークは 1 つのみしか確認できず、固定相に高い濃度の色素が残存した。そこで、カラム容積の増加に対する流速が遅いことを踏まえ、流速を 4 mL/min に増加し再度精製を行った。この時、固定相保持率は 57%であった。結果の HSCCC クロマトグラムを図 4 に示す。小カラムの結果と同様に 4 本のピークを得た。これらを分取して HPLC-HRMS により分析した結果を図 5-(a)~(d) に示す。小カラムの結果と比較した時、同様の傾向となっていることが分かった。流速 4 mL/min においてもピーク 3 の固定相への残存が考えられたため、固定相を濃縮して HPLC-HRMS 分析した。一方で、図 7 に示す様に当該ピーク 3 以外の成分が残存していることが確認された。このことから、ピーク 3 は既に溶出て済みであり、現状の注入量では検出感度が不足している可能性が示唆された。

D. 結論

本研究では、昨年度に決定した HSCCC による単離精製の条件を用いて、実際に CAG 標準品の獲得を試みた。初めに小カラムを用いて検討を行った結果、4 本のピークを認めたが、これらは HPLC の溶出とは別の傾向にあった。続いて、大カラムを用いて大量精製を試みた。流速を 4 mL/min とした時、小カラムと同様の溶出傾向を得て、主成分であるピーク 1 及び 2 については高純度品が獲得できることが示唆された。一方で、ピーク 3 については現状の注入量では検出感度が不足している可能性が考えら

れた． 今後は下記の計画で研究を進めていく．

- ・CAG 純品（ピーク 1, 2）の獲得及び NMR 等による構造決定．
- ・CAG 純品（ピーク 3）の単離精製条件の見直し．

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.

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

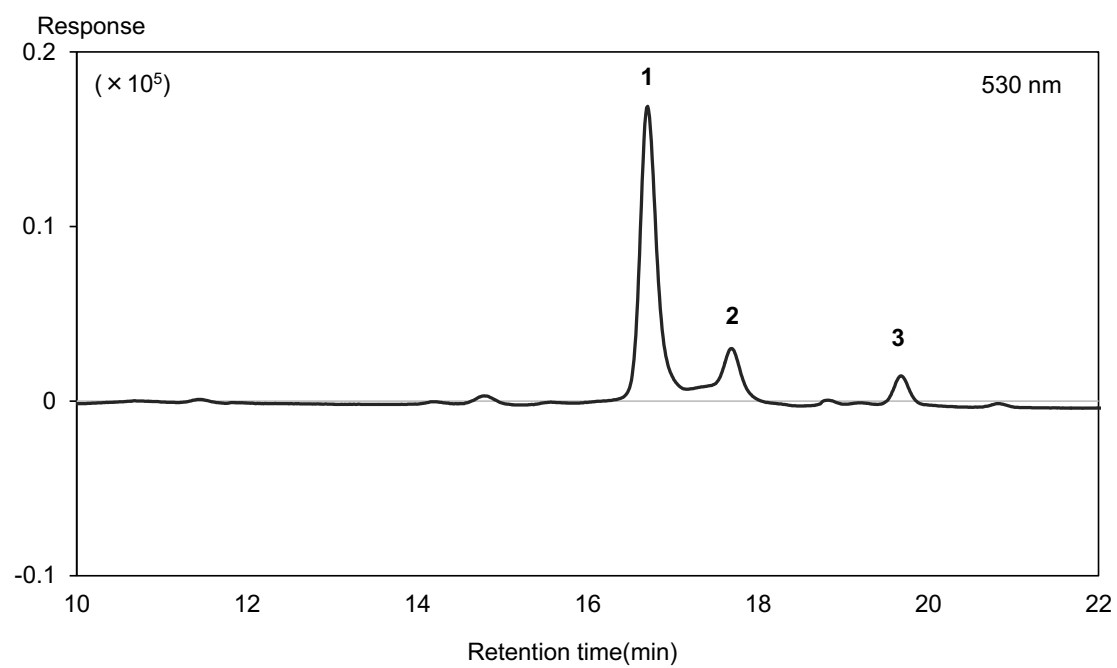


図 1. 色素原体の HPLC 測定クロマトグラム
検出波長は 530 nm

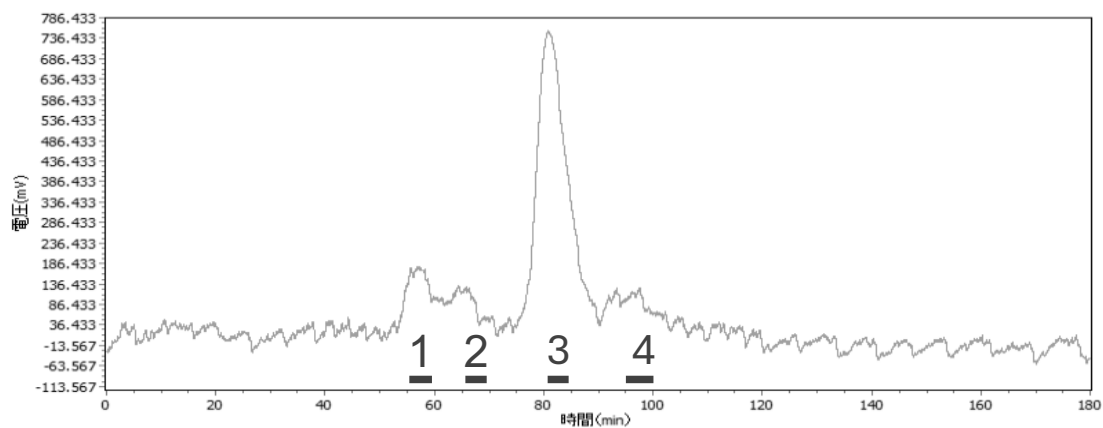


図 2. HSCCC による分離の予備検討結果

使用したカラムは 75 mL 容，回転速度は 1000 rpm，流速は 2 mL/min。この時の固定相保持率は 20%。検出波長は 530 nm とし，吸光が認められた区間（No. 1, 2, 3, 4）を分取した。

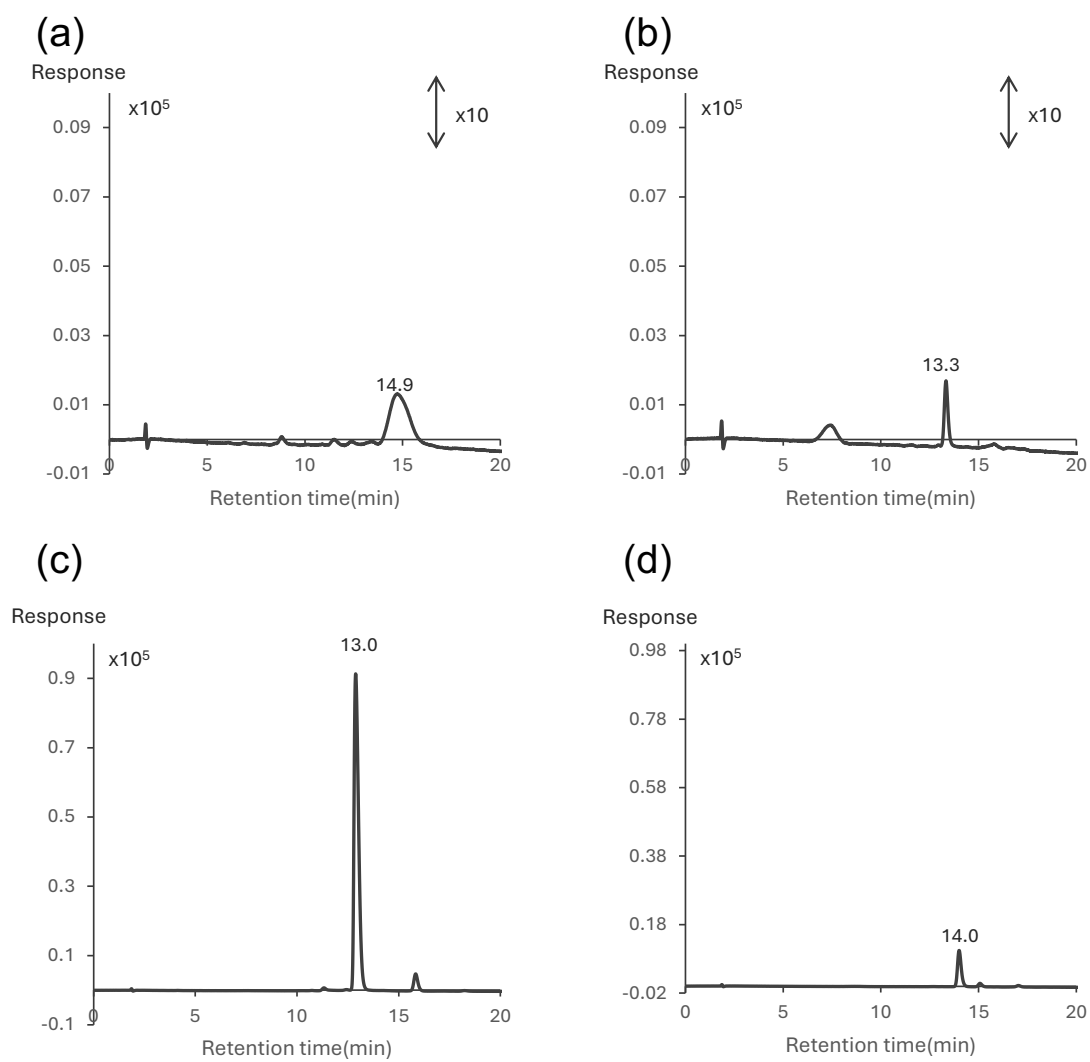


図 3. 単離精製のフラクションの HPLC 分析結果
 (a) No. 1, (b) No. 2, (c) No. 3, (d) No. 4. 検出波長は 530 nm.

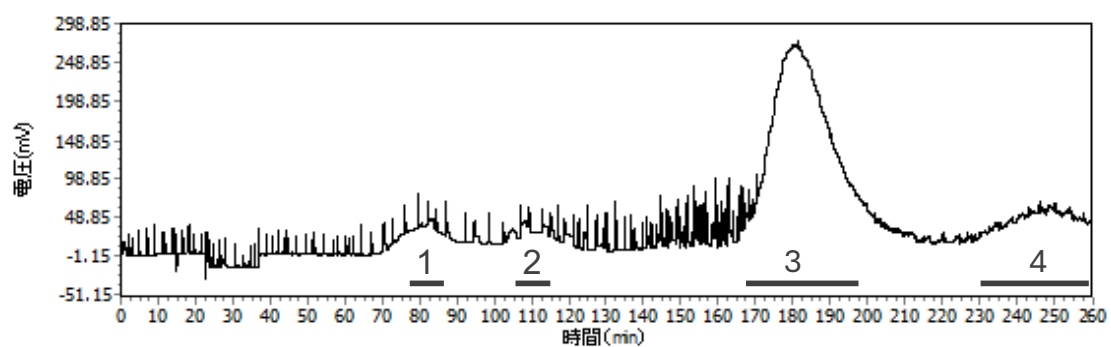


図 4. HSCCC によるムラサキヤマイモ色素の本精製

使用したカラムは 350 mL 容，回転速度は 1000 rpm，流速は 4 mL/min。この時の固定相保持率は 57%。検出波長は 530 nm とし，吸光が認められた区間（No. 1, 2, 3, 4）を分取した。

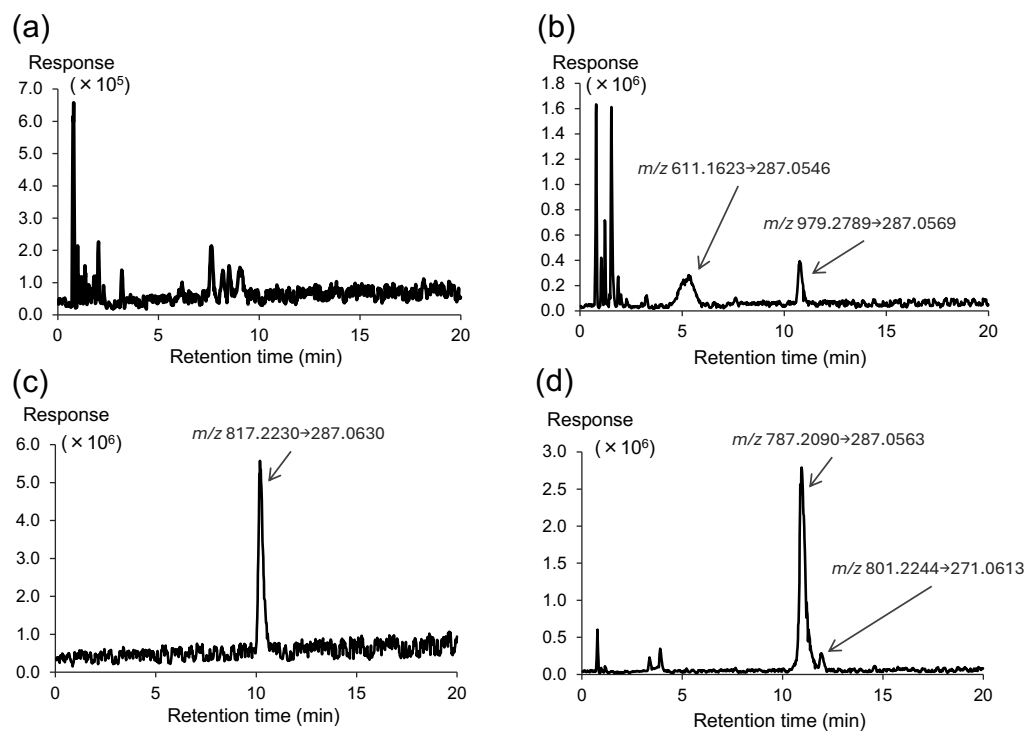


図 5. 分取したフラクションの HPLC-HRMS クロマトグラム

(a) No. 1, (b) No. 2, (c) No. 3, (d) No. 4. ノイズの影響を排除するためベースピークイオンクロマトグラムにて表示.

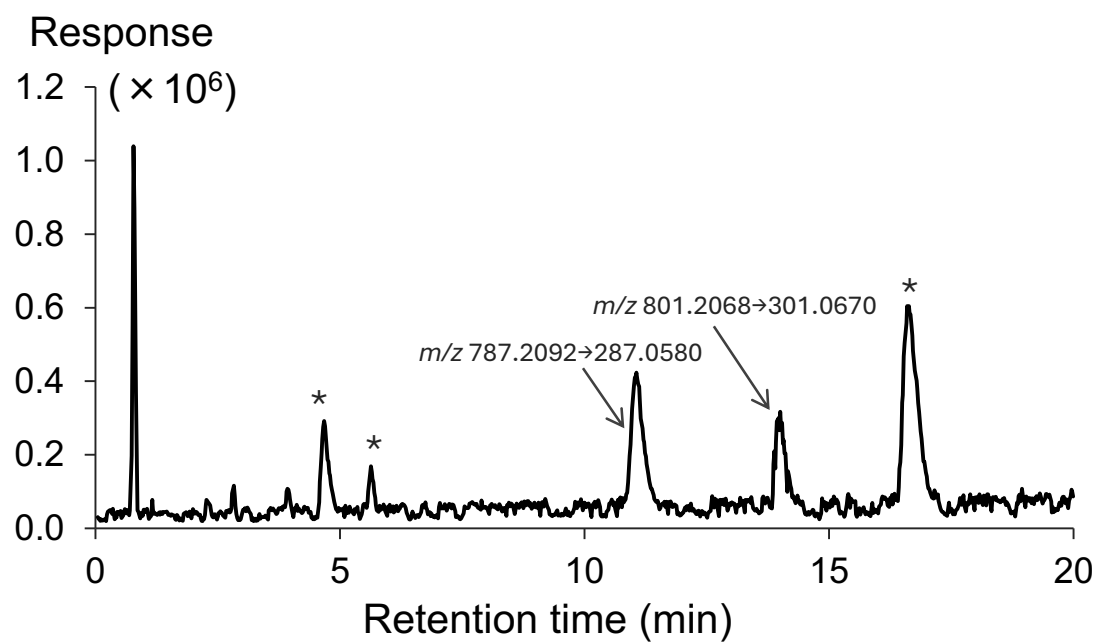


図 6. HSCCC 分取後の固定相濃縮物の HPLC-HRMS クロマトグラム
ノイズの影響を排除するためベースピークイオンクロマトグラムにて表示. *: 530 nm
に吸収無しであり, CAG 類ではないと考えられる.