

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5～7年度 総合分担研究報告書

既存添加物の成分組成に関する研究

天然色素に含まれる色素成分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 「第10版食品添加物公定書」または日本食品添加物協会「既存添加物自主規格(第6版)」に記載されている既存添加物について、成分規格に関する一次データを取得した。対象の既存添加物はアナトー色素、ムラサキヤマイモ色素、スピルリナ色素である。アナトー色素についてはシングルリファレンスHPLC定量法の構築を目指した。アナトー色素の主成分である、ビキシン、ノルビキシン及びこれらの幾何異性体に対し、シングルリファレンスのデザイン及び合成、相対モル感度を算出した。ムラサキヤマイモ色素については、HPLC定量法の確立に向け、LC-MSを用いた内容成分の構造同定及び色素製剤からの標準品の獲得を行った。その結果、主に3種のシアニジンあるいはペオニジンアシルグルコシドが検出され、これらの高速向流クロマトグラフィーによる単離精製検討を完了した。スピルリナ色素については、その主成分がタンパク質であるフィコシアニンのため、これの定性的分析法の確立を目指した。

研究協力者

高山卓大 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

本研究では、既存添加物のうち、天然色素の含有成分解析に関する分析およびその化学物質の評価を実施した。具体的には、アナトー色素、ムラサキヤマイモ色素、スピルリナ色素についてである。これらは第10版食品添加物公定書または日本食品添加物協会 既存添加物自主規格(第6版)に規定されている。その確認試験は色価、薄層クロマトグラフィーや吸光度法などであり、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が用いられていなかった。そこで、本研究では、既存添加物の主成分の成分規格を検討し、簡便かつ高精度な HPLC 分析法を構築することとした。

アナトー色素

アナトー色素(Annatto Extract)は第10版食品

添加物公定書(以下、公定書)において、ベニノキ(*Bixa orellana* L.)の種子の被覆物から得られたものである。なお、ノルビキシン(Norbixin, NBx)を主成分とするもの及びビキシン(Bixin, Bx)を主成分とするものがあり、それぞれを NBx 及び Bx と定義されている。Scotter らの報告では、アナトーの主成分である NBx 及び Bx はそれぞれ *trans*-/*cis*-体が存在しており、それぞれを測り分ける必要がある。幾何異性体は、一般的に逆相系 ODS で分離可能であるが、これらの単一標準品は入手困難である。加えて、これらの異性体は光や熱によって互いに変換する可能性が示唆されている。そのため、標準品自体の安定性を担保する必要がある。標準品を用いた一般的な高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法では常にその懸念が生じる。そこで、入手不可能な *trans*-NBx および *trans*-Bx を合成、並びに相対モル感度(RMS)を用いた Single Reference(SR) HPLC の開発へ繋げることとした。SR-HPLC を開発するにあたり、本件研究班では

新たに赤色領域に特化した SR をデザインした。今回提案する SR は、アナトーを含めて、天然カロテノイド色素の定量分析に広く適用できるものと考えられる。

ムラサキヤマイモ色素

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。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。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、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。そこでまず、HPLC-高分解能質量分析計(HRMS)にてプロファイリングし、定量の対象とするCAGを設定した。これらのピーク由来の市販標準品は入手不可能であったため、高速向流クロマトグラフィー(HSCCC)による単離精製を目指した。

スピルリナ色素

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(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。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(PCB)であ

る。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、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、HPLCあるいはHPLC-MS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。定性・定量の対象物質としては、スピルリナ色素の主成分であるPYCとした。4つの市販青色色素(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))を対象として、まず初めに公定書記載の確認試験により判別可能か確かめた。また、適切なHPLC分離及び検出条件を検討した。さらに、酵素消化法を用いた発色団の構造に関する定性分析を実施した。

B. 研究方法

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

コントローター：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)

コントローター：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 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
 NMR 装置：JEOL 社製 ECZL-600

アナトー色素

NBx 及び Bx 試薬製品は、富士フイルム和光純薬社製を用いた。アナトー色素製剤は、ノルビキシシ(保存番号 NBx0001)を用いた。

HPLC 分離分析

粉末の対象試料は DMSO により溶解し、メタノール/水(90/10, V/V)混液を用いて希釈した。移動相には、0.1 vol%酢酸水溶液/0.1 vol% 酢酸メタノールを使用し、10/90 をアイソクラティック条件により、10 分の分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100Z 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：460 nm

注入量：10 μL

SR デザイン

国立医薬品食品衛生研究所有機化学部との共同により、SR 候補化合物を検討した。すなわち、極大吸収波長 450～500 nm で検出できる化合物の合成を検討した(図 2)。

¹H-qNMR による *trans/cis*-NBx, Bx および SR の絶対定量

DSS-*d*₆ 標準品を 10 mg を DMSO-*d*₆ に溶解し、これを希釈溶媒とした。測定対象化合物 10 mg を希釈溶媒にて 2 mL または 3 mL に溶解し、そのうちの 0.5 mL を NMR 試験管に移し、¹H-qNMR で内標準法により定量した。

Data points：60,000

Flip angle：90°

Pulse delay：60 s

Scans：8 times

Probe：25℃

Software: JEOL 社製 Purity Pro qNMR ANALYSIS Software

RMS 算出

qNMR の定量結果を用いて、絶対検量線の範囲は 0～100 mg/L と設定し、RMS を求めた。

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。

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

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

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

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

上記より、NBx および Bx の RMS を、SR に対する NBx および Bx の絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0 mol/L のピーク面積は検量線の原点とした

ムラサキヤマイモ色素

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。

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 μL を取り、400 μL のメタノール/水(50/50, V/V)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。

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：スクリーニングを実施し、最適であった TSKgel ODS-100Z column (4.6×150 mm, 5 μm, 東ソー社製)を用いた。

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

HSCCC による単離精製

分配係数の条件検討

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を用いた。溶媒条件の最適化に供する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 μL 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 μL 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 μL 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。

HSCCC の分取条件

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。

スピリリナ色素

青色素 4 製品(スピリリナ色素 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。

公定書確認試験

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。公定書の記載に従って、確認試験(1)～(6)に該当する試験を実施した¹⁾。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。

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：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 μ L

酵素消化法による発色団の検出検討

アミノ酸 I 残基レベルへの消化方法

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。

トリプシンによるペプチドマッピングに基づく消化方法

還元的アルキル化未実施検体(未還元)：1 mg/mL の PYC 溶液(50 mmol/L 重炭酸アンモニウム-2 mol/L 尿素にて溶解)を調製し、400 μ L を消化に供した。

還元的アルキル化実施検体(還元)：4 mg/mL の PYC 溶液(50 mmol/L 重炭酸アンモニウム-2 mol/L 尿素溶液にて溶解)を調製し、100 μ L を分取した。そこに DTT 溶液 25 μ L を加えて、37°C で 30 分間反応させた。その後、IAA 溶液の 75 μ L を加えて、遮光下で 37°C, 30 分間反応させた。得られた溶液を 50 mmol/L の重炭酸アンモニウム溶液で希釈し、全量を消化に供した。

酵素消化条件

MonoSpin Trypsin にて下記のプロトコールに従い実施

平衡化：50 mmol/L の重炭酸アンモニウム溶液 500 μ L を通液(2000 $\times$ g, 1 分間)

試料ロード：2000 $\times$ g, 1 分間

反応：37°C で 60 分間

溶出：50 mmol/L の重炭酸アンモニウム溶液 500 μ L(サンプル溶液)を通液(2000 $\times$ g, 1 分間)

MonoSpin C18 にて脱塩

脱塩条件

平衡化：アセトニトリル 200 μ L 及び 0.1%TFA 200 μ L を通液(各 2300 $\times$ g, 1 分間)

保持：サンプル溶液 200 μ L に 0.1%TFA を 600 μ L 添加して全量をチャージ(2300 $\times$ g, 2 分間)

洗浄：0.1%TFA の 200 μ L を通液(2300 $\times$ g, 3 分間)

溶出：60%アセトニトリル溶液の 200 μ L を通液(2300 $\times$ g, 2 分間)

溶出液を濃縮乾固し、5%アセトニトリル溶液の 100 μ L で再溶解し、測定サンプルとした。

C. 結果及び考察

アナト一色素

図 1 には標準品溶液の HPLC クロマトグラムを示す。ピーク面積百分率からその純度は、NBx で 91.1%及び Bx で 97.0%となった。また、既報の HPLC クロマトグラムと比較して、いずれも *cis* 体と考えられた。一方で、大小さまざまなピークが検出されており、保管中の劣化等による分解の可能性が示唆された。従って、一般的な絶対検量線を用いた HPLC 法では、応答を過小評価してしまう可能性が考えられ、安定に存在する別の定量指標を確立する必要があると考えられた。そこで、同様の極大吸収波長を示し、類似した溶出挙動をとる SR の開発に取り組むこととした。HPLC(検出波長：460 nm)により、デザインした 6 種類の SR 及び NBx/Bx 混合溶液を用いて比較を行った結果、NBx と Bx の不純物を考慮して、n-C₁₁ がもっとも適切であると考えられた(図 2)。続いて、¹H-qNMR を実施し、各成分の純度を算出した。¹H-qNMR 用標準物質として、DSS-*d*₆(純度 92.4%)を用いた。各対象物質の ¹H-qNMR スペクトルを図 3 に示した。その結果、*cis*-NBx は 68.9%, *cis*-Bx は 97.2%, *trans*-NBx は 15.5%, *trans*-Bx は 41.9%, n-C₁₁ は 94.1%であった。各対象物質の NMR 試験管の試料溶液を用いて、HPLC 用標準溶液を調製し、純度

補正後の絶対検量線を作成した(原点通過, 0~100 mg/L, 図 4). 本検量線より $n\text{-C}_{11}$ に対する各分析対象物質の RMS を算出した結果, *cis*-NBx は 13.7, *cis*-Bx は 11.5, *trans*-NBx は 13.9, *trans*-Bx は 10.2 であった. 以上の結果から, 開発した SR-HPLC 法により, アナトー色素 Bx/NBx の安定的測定が可能なものと考えられた.

ムラサキヤマイモ色素

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 5-(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. 次に, 図 6-(a)~(e)には検出波長域 200-800 nm での 2 次元クロマトグラムを 5 本のカラムにて比較した結果を示す. 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 7-(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. 図 8-(a)~(f)に示す通り, ピーク 1 m/z 817.2230(9.76 分), ピーク 2 m/z 787.2090(10.53 分)及びピーク 3 m/z 831.2368(12.42 分)の精密質量でイオンが検出された. これらのアントシアニン類の MS/MS スペクトルを考えると, m/z 287.06 周辺, m/z 301.07 周辺のフラグメントイオンが検出されていた. 既報ではアグリコンがシアニジン骨格のもので前者, ペオニジン骨格のもので後者が生じると知られている. これを踏まえると, それぞれのピークは図-9(a)~(c)の構造を有することが推定された.

標準品獲得に向けた HSCCC の最適溶媒検討

の結果を表 1 に示す. 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/V*)を設定することができた. この溶媒系において効率的な単離精製が可能と考えられたため, 大カラム(350 mL 容)を用いた単離精製を実施した. 本条件に固定相保持率は 57%であった. 結果の HSCCC クロマトグラムを図 10-(a)に示す. 4 本のピークの溶出が認められた. これらを分取して HPLC-HRMS により分析した結果を図 10-(b)~(e)に示す. 固定相には依然として赤色を呈していたため, 固定相を濃縮して HPLC-HRMS 分析した. その結果, 図 11 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 は既に溶出で済みであり, 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.

以上の結果から, 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 の獲得には継続の検討が必要なことが示唆された.

スピルリナ色素

国内で市販される 4 つの青色素製剤を指標として, 公定書記載の確認試験により定性が可能かを検討した. 結果を表 2 に要約した. 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剤で 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, リナブルーとスピルリナパウダー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, 全ての製剤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, 全種で明確な色調の変化は認められなかった. 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、リナブルーとスピルリナパウダー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 種では、クチナシ青やバタフライピーと比べ、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。確認試験(2)及び(5)によりスピルリナ色素の識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。従って、続いて HPLC 測定法の検討を実施した。低分子向けの HPLC 用カラムである、Shim-Pak Scepter C18-120 を用いた結果、いずれの製剤についてもピーク形状が不良であり、定量には不向きであった。そこで、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 12-(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。これらの内、再現性に優れた適切なモニタリングイオンを選定することで、詳細な解析が可能となると考えられる。一方で、上記では PYC の定性面での情報量に欠けるため、続いて HPLC-HRMS を用いた発色団構造の定性的分析について検討した。アミノ酸 1 残基レベルまでへの消化方法を検討した消化後の溶液について、Accura Triart Bio C18 により分析した結果を図 13-(a)~(d)に示す。スピルリナ色素 1 において、6 分周辺に明確なピークを認め、スピルリナ色素 1 及び 2 において図 12 と比較して明確に異なる傾向を得た。当該ピークを HPLC-HRMS に供した結果、 $[M+H]^+$ のイオンとして、 m/z 706.2921 が検出された。発色団の構造を PYC としてその断片の m/z を推定すると、 m/z 708.3066 で検出されると考えられ、その差は水素二つ分に相当した。この結果から、検出された原子団

がジヒドロビリベルジンである可能性が考えられたが、測定前処理時に生じたものかを明確にするため、トリプシン消化により発色団を有するペプチドが検出できるか検討した。前処理として還元的アルキル化の有無が与える影響を検討した結果、いずれにおいても結果に大きな変化を与えなかったことから、必要以上の前処理を避けるため還元的アルキル化は未実施の検体をペプチド解析に用いた(図 14-(a)~(c))。図 15-(a)及び(b)には、保持を増加させた系にて HPLC 及び HPLC-HRMS 分析を行った結果を示す。検出波長 620 nm において溶出時間 25 分及び 30 分周辺に二つの主ピークを認め、それぞれ対応する位置に MS クロマトグラム上のピークを検出することが出来た。この関連イオンの抽出クロマトグラム及び MS スペクトルを図 16-(a)及び(b)に示す。25 分周辺のイオンは $[M+H]^+$ のモノアイソトピック m/z で 935.4476 に検出された。30 分周辺のイオンは $[M+H]^+$ のモノアイソトピック m/z で 1250.6126 に検出された。いずれのイオン種も 3 価までのイオンが良好に検出された。それぞれのピークをデコンボリューションし、MS/MS 解析を行った結果を図 16-(c)及び(d)に示す。これらのペプチドには、共通して m/z 587.2851 のフラグメントイオンが認められ、これは PCB に由来するフラグメントイオンの m/z に相当した。アミノ酸配列の b/y 帰属を行った結果を図 17-(a)及び(b)に示す。これらの配列は、それぞれ PYC の α 鎖及び β 鎖の構造を支持しており、発色団は PYC 上に PCB の構造として存在していることが考えられた。

D. 結論

アナトー色素

市販標準品 NBx および Bx は、HPLC クロマトグラム上で多数の分解由来ピークを示し、純度は NBx 91.1%、Bx 97.0% と限定的であった。また *cis/trans* 異性化が確認され、既存標準品による絶対検量線法では応答の過小評価が懸念された。そこで、安定な他の定量的指標として同等の吸収特性と溶出挙動を示す 6 種類の SR

を設定し、溶出時間を比較した。その結果、*n*-C₁₁ が最適 SR として選定された。¹H-qNMR により各化合物の純度補正を行い、*n*-C₁₁ を用いた純度補正済みの絶対検量線を構築したところ、*cis*-NBx, *cis*-Bx, *trans*-NBx, *trans*-Bx の RMS が確立された。以上より、*n*-C₁₁ を用いた SR-HPLC 法により、アナトー色素 Bx/NBx を安定かつ高精度に定量する手法を確立できた。

ムラサキヤマイモ色素

ムラサキヤマイモ色素は既知のムラサキイモ色素と同様に 520 nm 付近に極大吸収を示し、アントシアニンを主成分とすることが確認された。5 種類のカラム比較から TSKgel ODS-100Z が最良のピーク形状を示し、HPLC-HRMS により主要ピークとして *m/z* 817.2230, 787.2090, 831.2368 をそれぞれ検出した。MS/MS 解析からは、いずれもシアニジンあるいはペオニジン骨格を持つアントシアニン誘導体であることが示された。HSCCC による最適溶媒系を確立し、大型カラムで分取を行った結果、主要成分であるピーク 1 およびピーク 2 については高純度で単離可能であることが示唆された。一方ピーク 3 は保持後の固定相に残存が確認され、さらなる精製条件最適化が必要であることが明らかとなった。

スピルリナ色素

市販青色素製剤を用いた公定書法による識別試験では、蛍光消失・次亜塩素酸反応などでスピルリナ色素の識別が可能であったが、反応は明確でなく、定量法としての応用は困難であった。そこで HPLC 法を検討した結果、低分子用 C18 カラムでは適切なピークが得られなかったが、タンパク質分析向けの Accura Triart Bio C18 にて良好なピーク形状が得られ、特にスピルリナ色素含有製剤に共通する 9-11 分付近のピークは PYC 由来成分であると示唆された。さらに消化液を用いた HPLC-HRMS 解析では、*m/z* 706.2921 などの発色団を検出し、トリプシン消化物からは *m/z* 935.4476 および 1250.6126

の PYC α 鎖および β 鎖由来ペプチドが確認された。MS/MS における *m/z* 587.2851 の共通フラグメントは PCB 発色団の存在を支持し、発色団構造が PYC 上に保持されていることを明確にした。

E. 研究業績

1. 学会発表等

- (1) 中森洋紀, 布目真梨, 辻徹一郎, 出水庸介, 増本直子, 永津明人, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシシ及びノルビキシシの分析. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第26回年次大会(2023.7).

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

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.

表 2. スピルリナ色素の確認試験の結果要約

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)	○	○	○	○

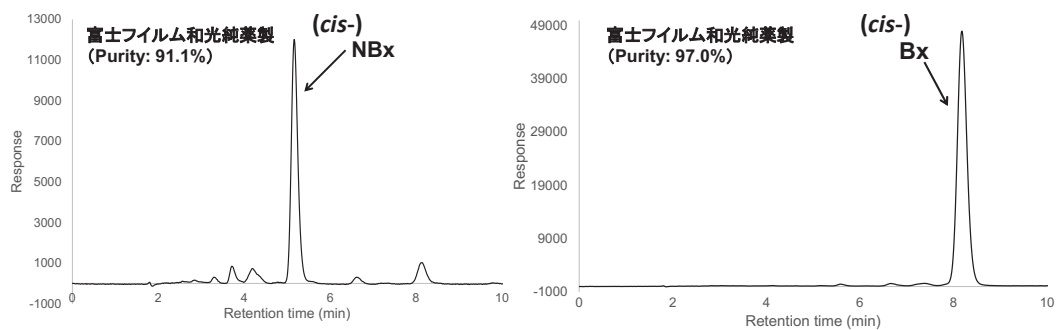


図 1. NBx 及び Bx 標準溶液の HPLC クロマトグラム

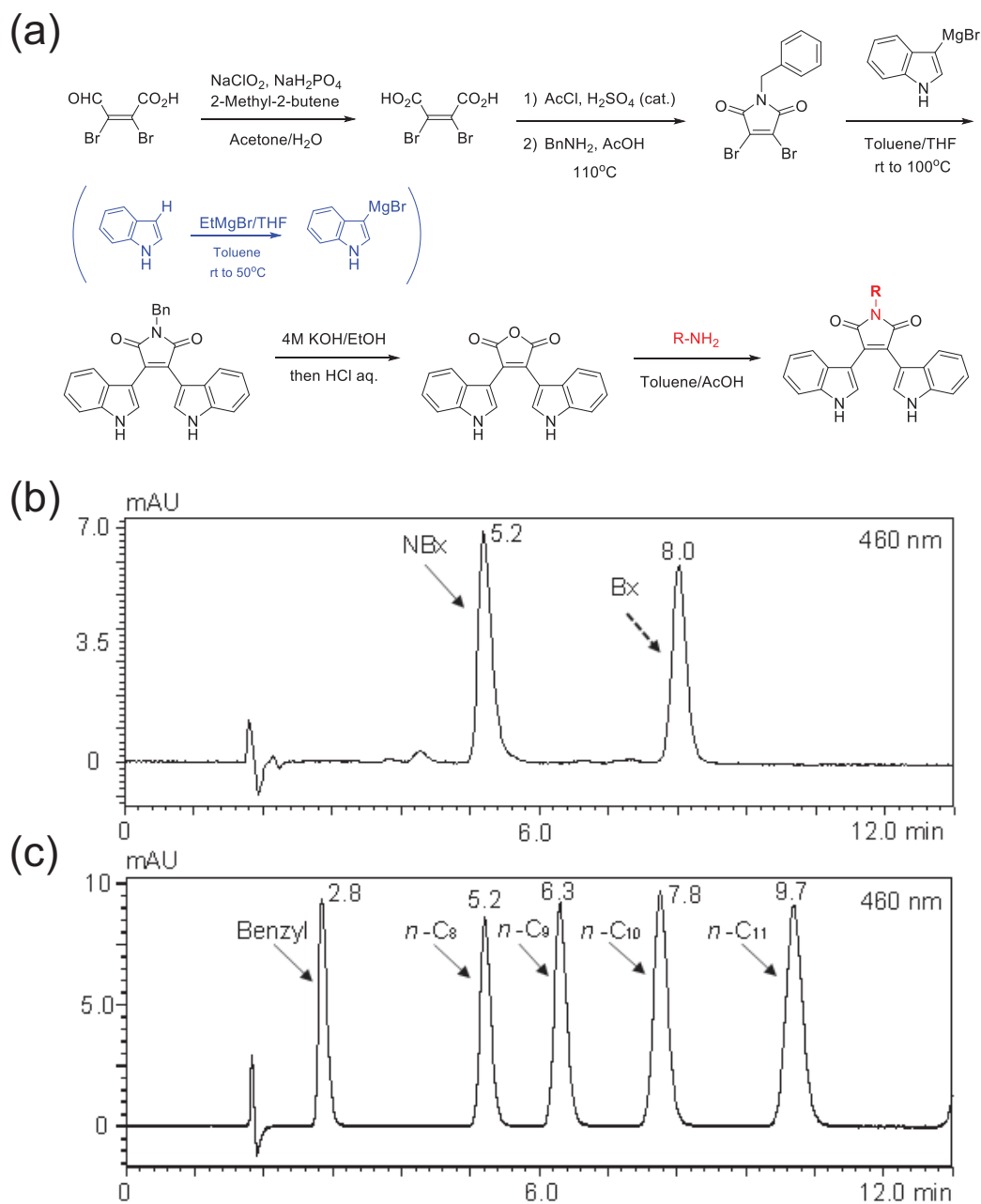


図 2. SR-HPLC 法による Bx/NBx の分析法基礎検討

(a) SR の合成経路. R には Benzyl 及び n -C₈~C₁₁ のものを合成した. (b) Bx/NBx 混合標準品の測定結果. (c) SR の測定結果. いずれも 2 μ g/mL の溶液を測定.

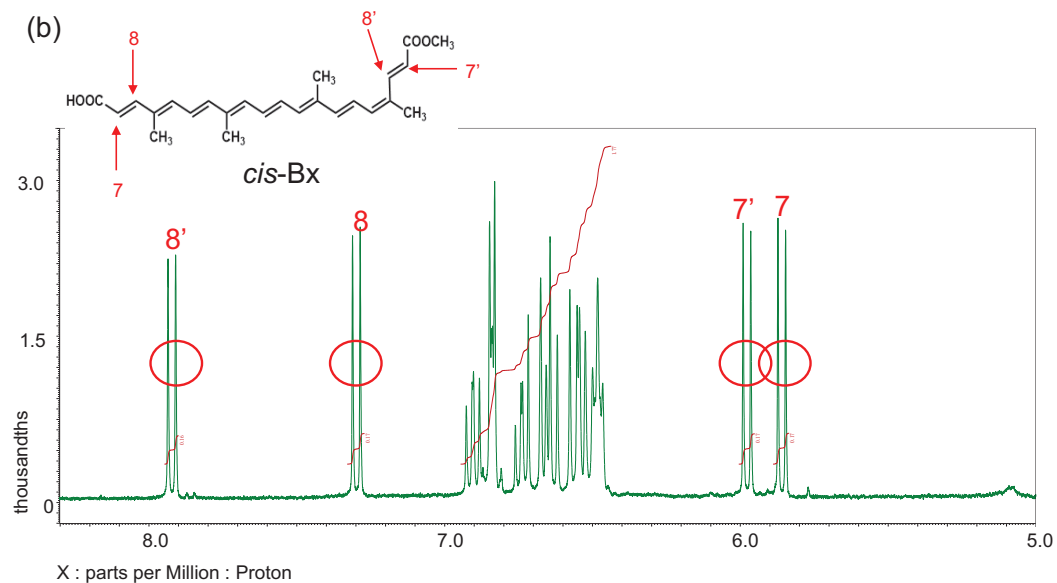
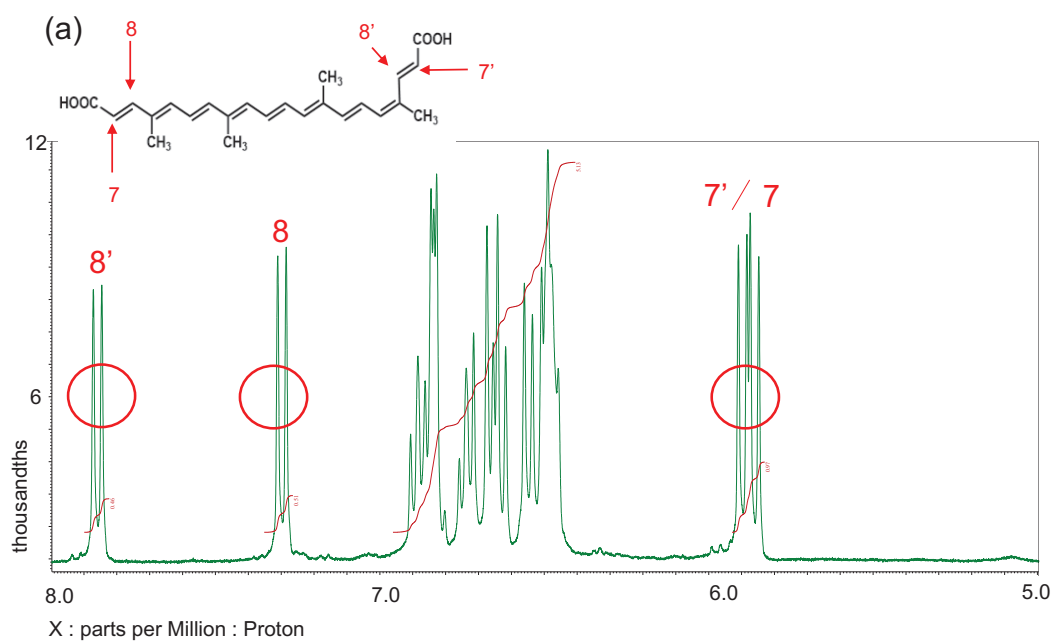


図 3. *cis/trans*-Bx/NBx および *n*-C₁₁ の qNMR スペクトル(その 1)

(a)*cis*-NBx (b)*cis*-Bx

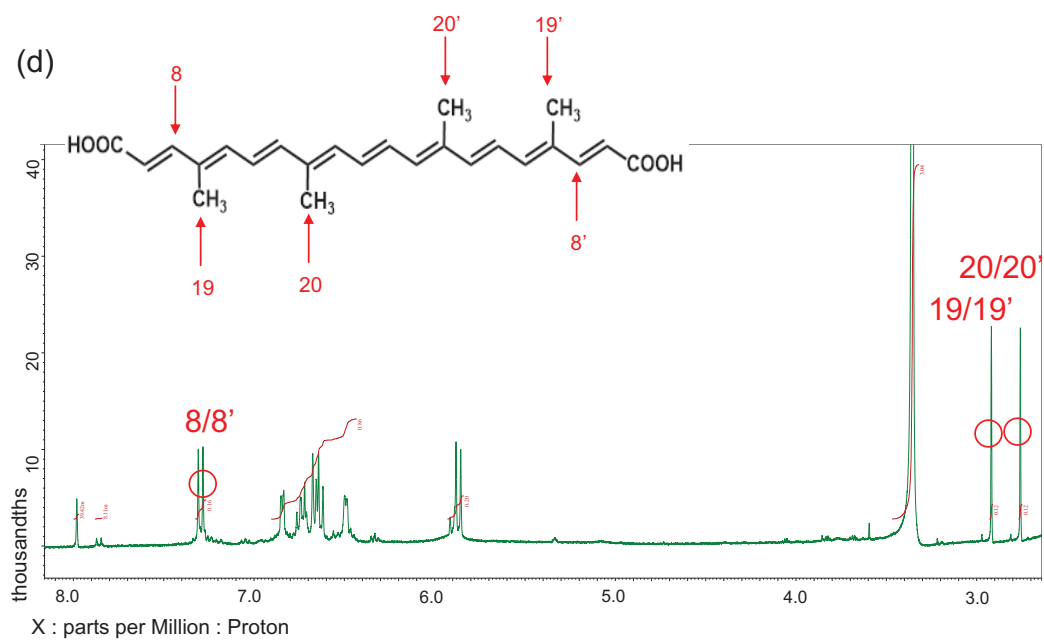
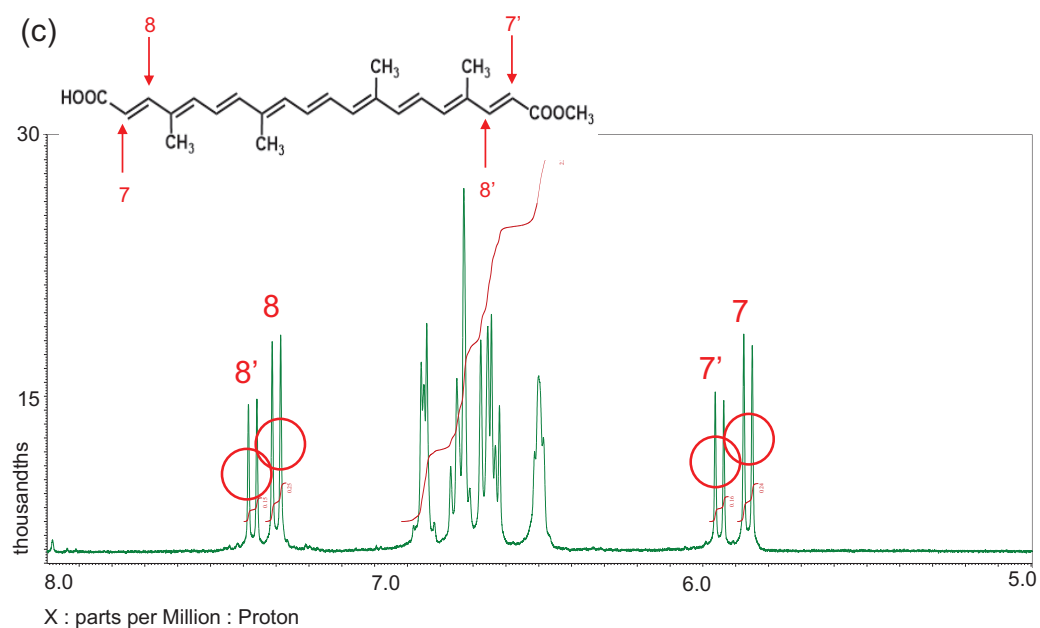


図 3. *cis/trans*-Bx/NBx および *n*-C₁₁ の qNMR スペクトル(その 2)

(c)*trans*-NBx (d)*trans*-Bx

(e)

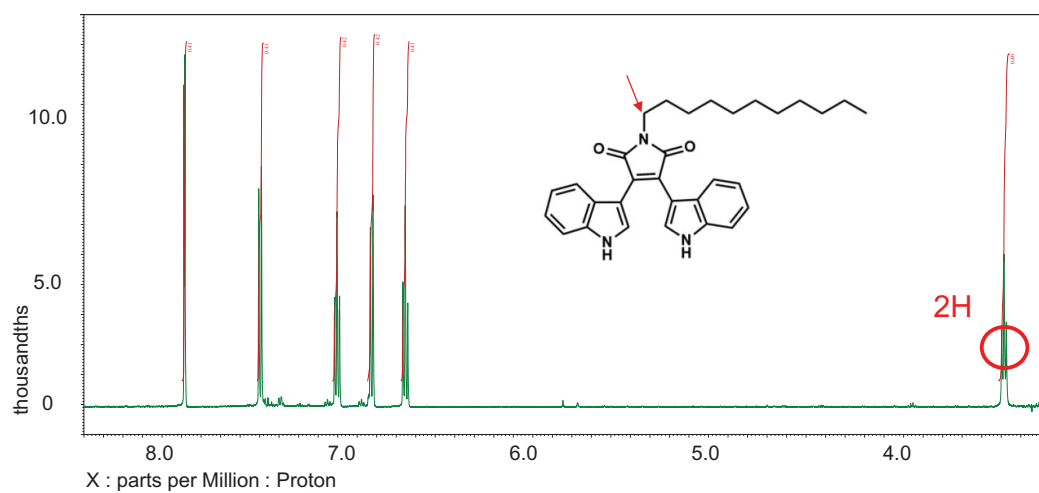


図 3. *cis/trans*-Bx/NBx および n-C₁₁ の qNMR スペクトル(その 3)

(e)n-C₁₁

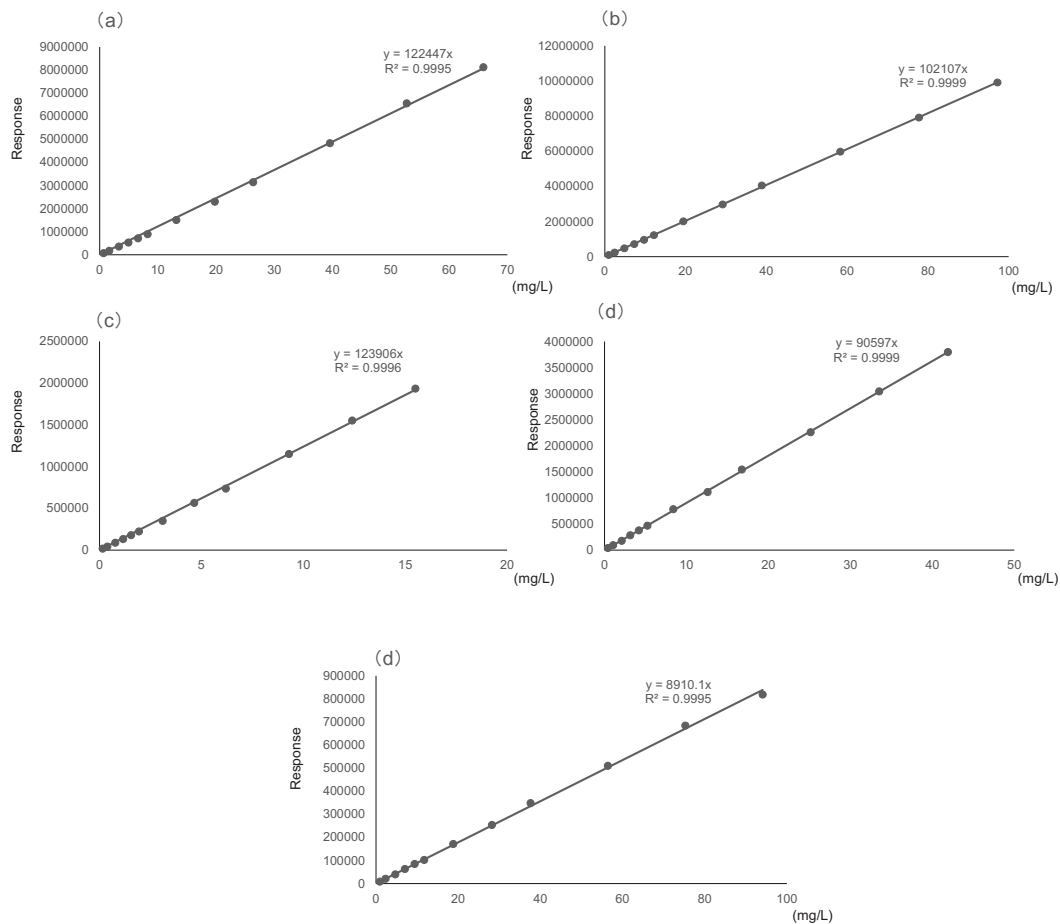


図 8. 純度補正後の NBx, Bx, 及び n-C₁₁ の検量線

(a) *cis*-NBx($y = 122447x$, 相関係数 0.999)

(b) *cis*-Bx($y = 102107x$, 相関係数 0.999)

(c) *trans*-NBx($y = 123906x$, 相関係数 0.999)

(d) *trans*-Bx($y = 90597x$, 相関係数 0.999)

(e) n-C₁₁($y = 8910.1x$, 相関係数 0.999)

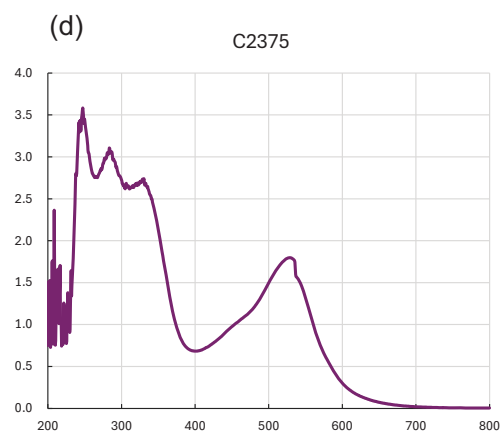
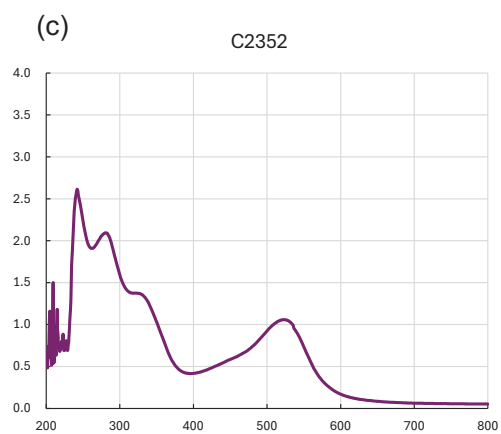
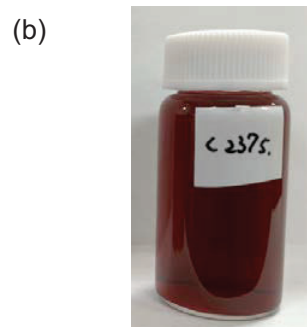
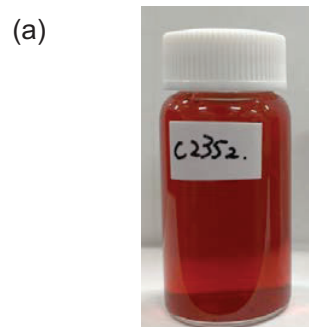


図 5. 色素原体の外観と検出波長の検討

(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 pH3.0 のクエン酸緩衝液中で観測

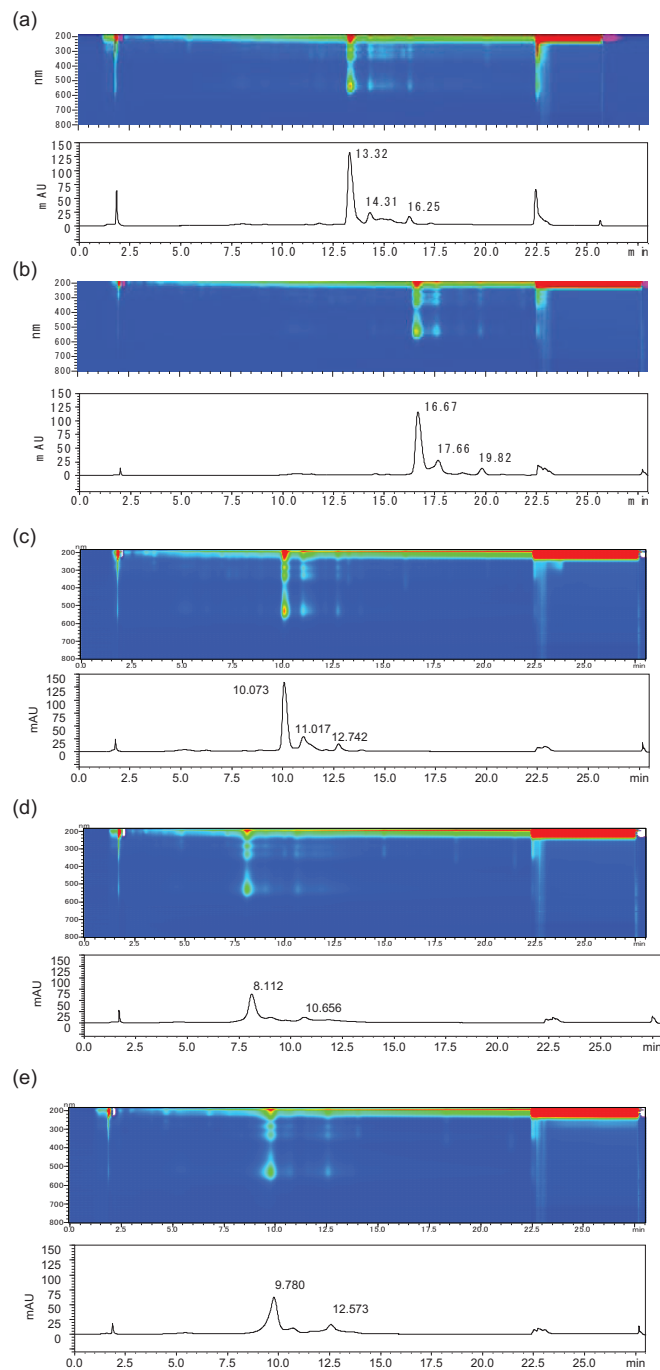


図 6. 分析カラムのスクリーニング結果

(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)

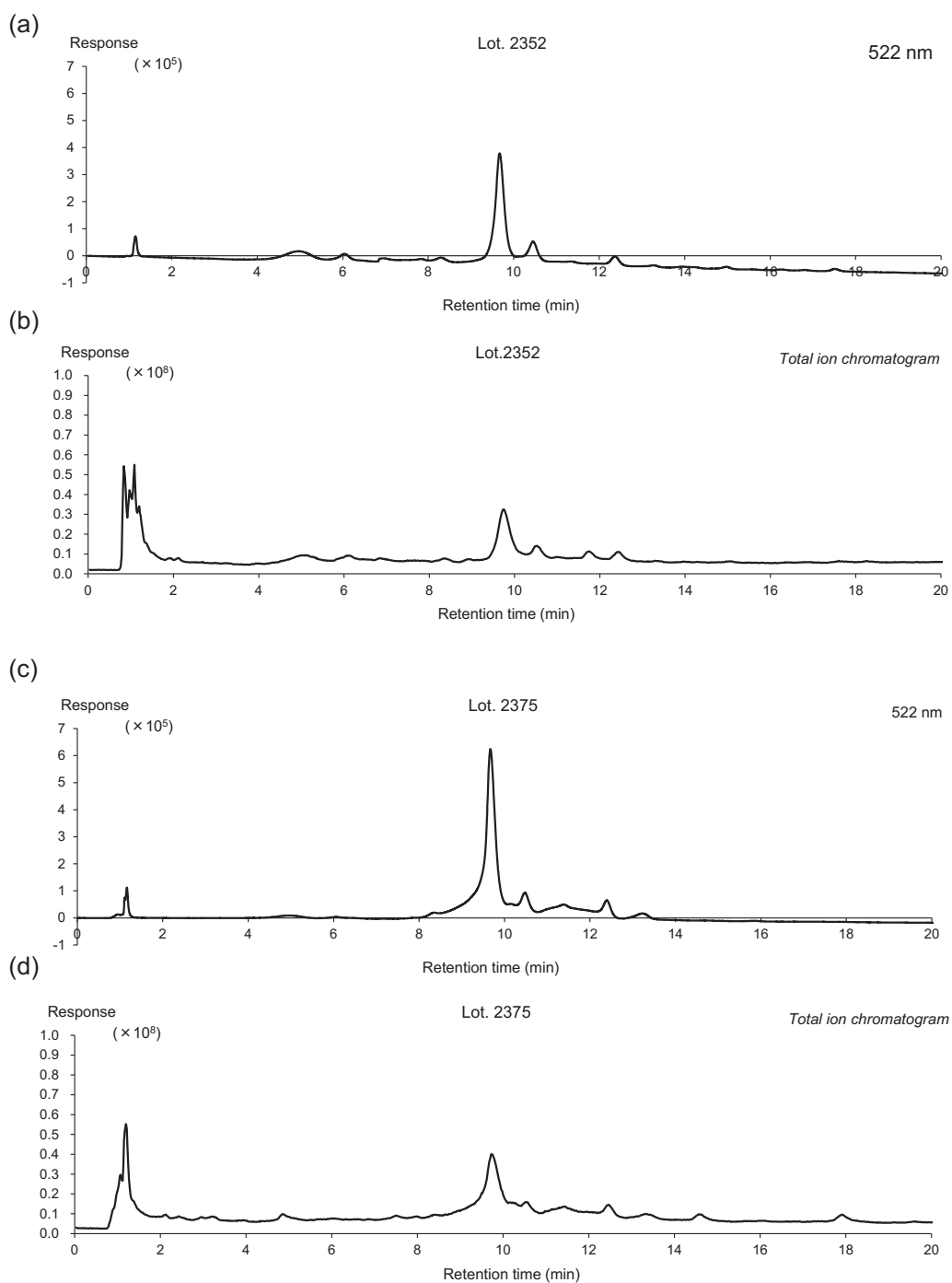


図 7. HPLC 及び LC-MS のクロマトグラム

(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

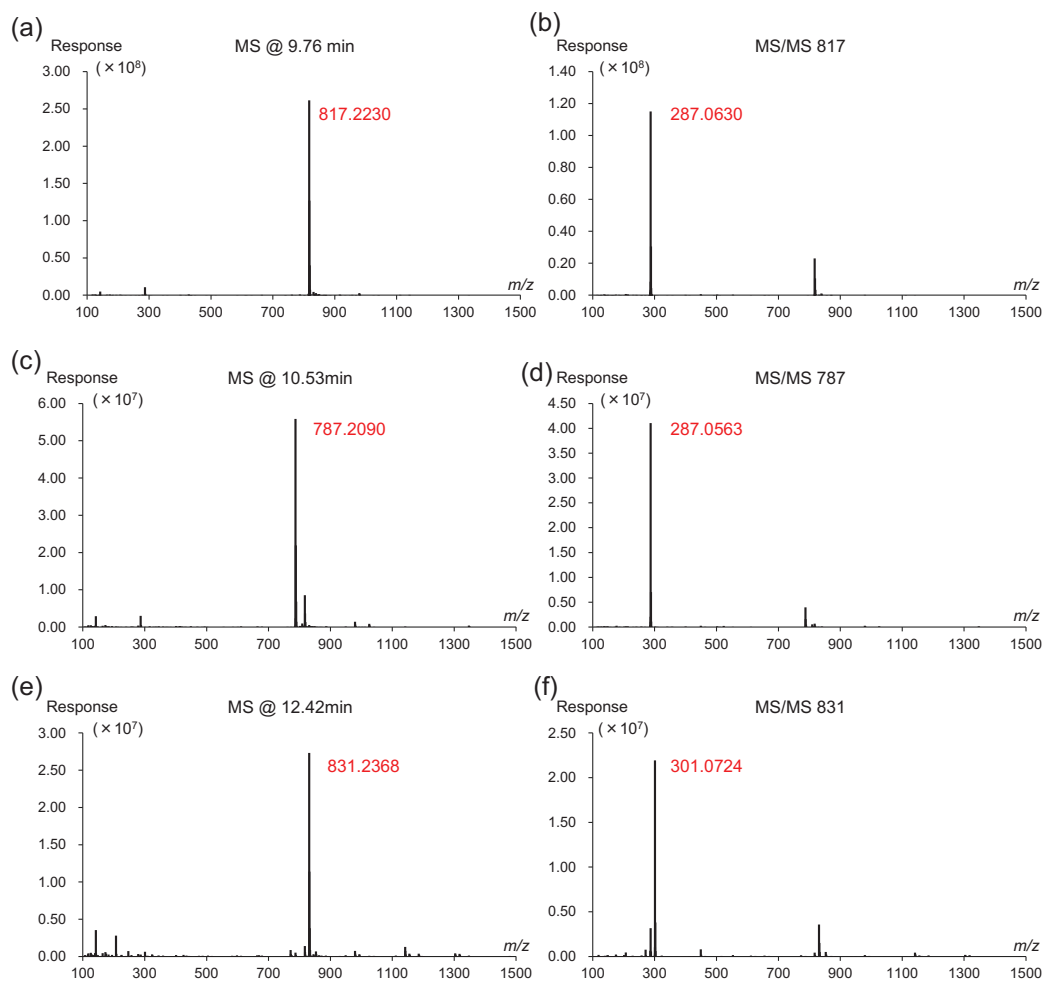


図 8. 各ピークの MS 及び MS/MS スペクトル

(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

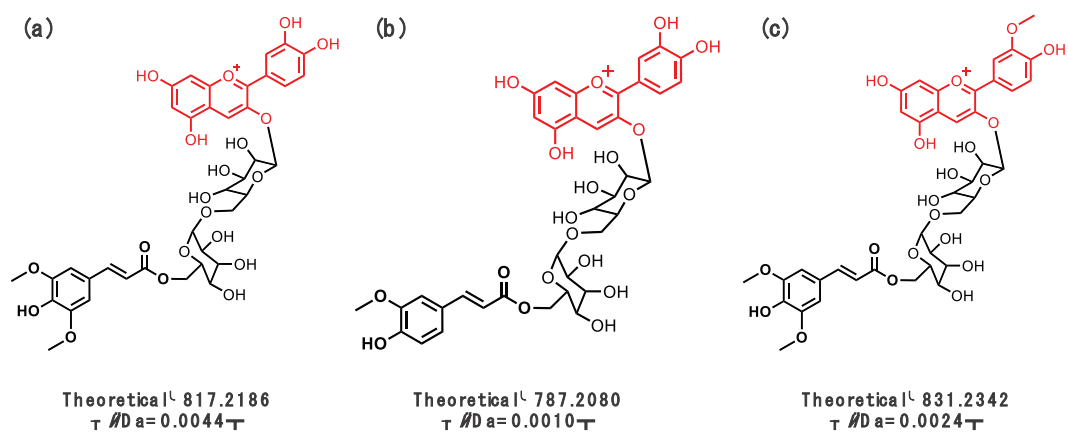


図 9. 推定される構造

- (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

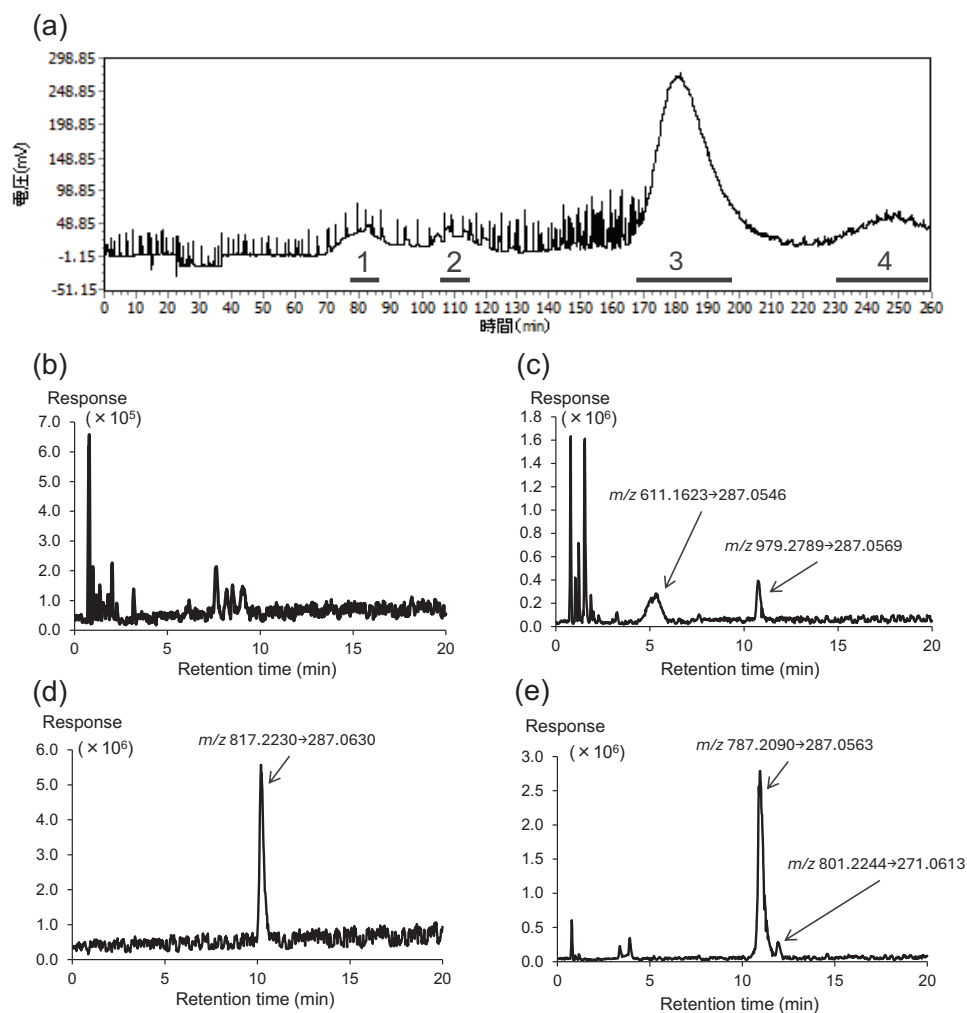


図 10. HSCCC による単離精製の結果

(a) HSCCC クロマトグラム：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. HPLC-HRMS クロマトグラム：(b) No. 1, (c) No. 2, (d) No. 3, (e) 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.

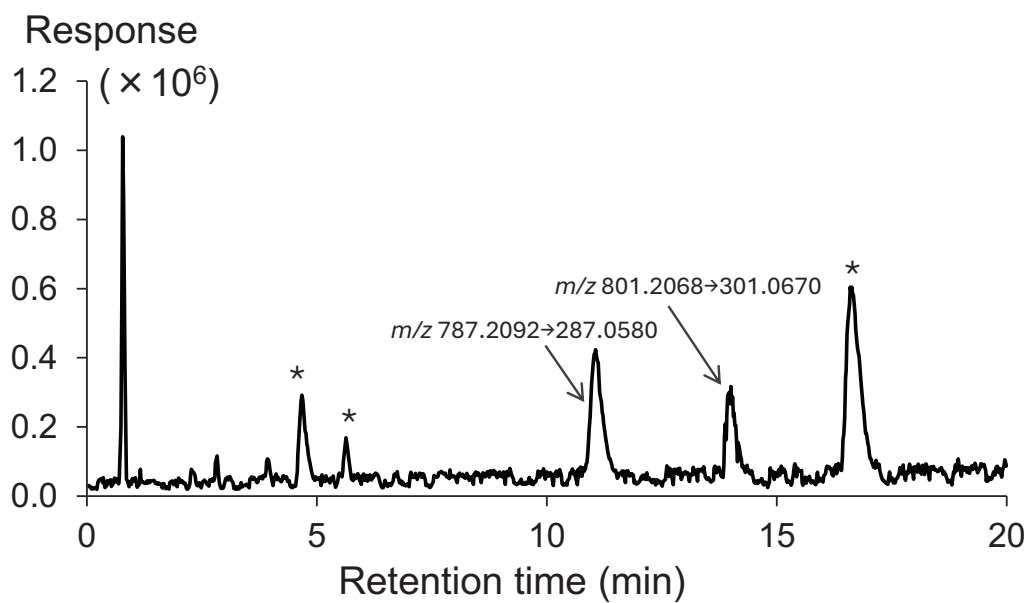


図 11. HSCCC 分取後の固定相濃縮物の HPLC-HRMS クロマトグラム
ノイズの影響を排除するためベースピークイオンクロマトグラムにて表示. * : 530 nm
に吸収無しであり, CAG 類ではないと考えられる.

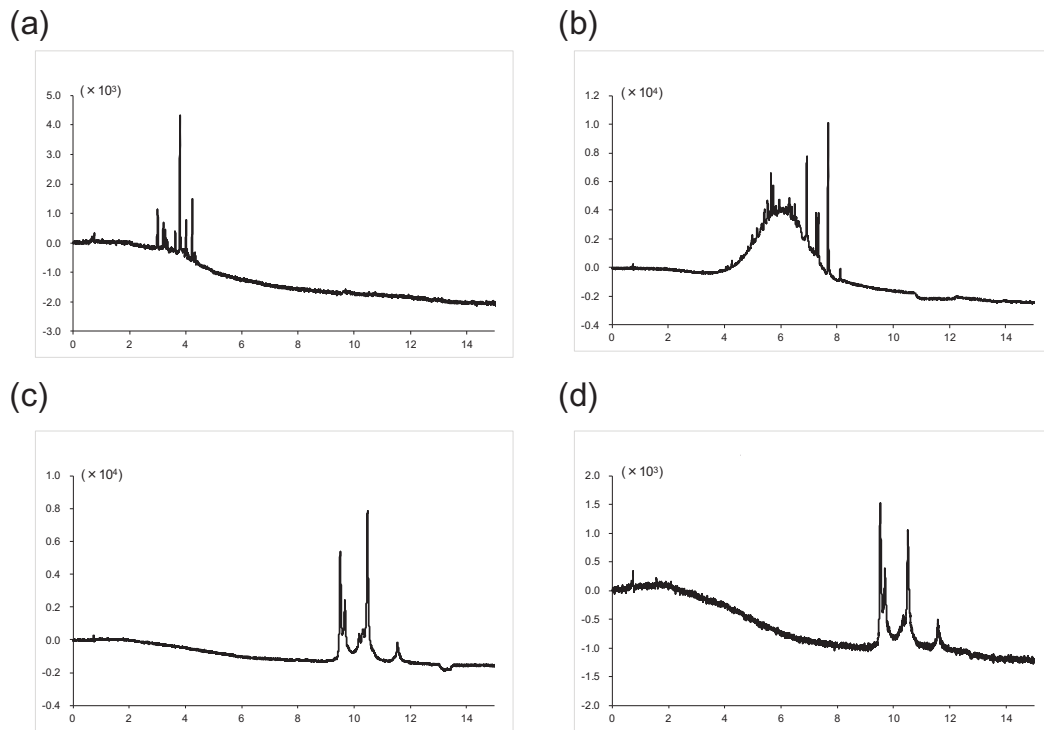


図 12. 分析カラム Accura Triart Bio C18 を用いた際の HPLC クロマトグラム

(a)バタフライピー色素, (b)クチナシ青色素,
(c)スピルリナ色素 1, (d)スピルリナ色素 2.

検出波長は 620 nm で検出.

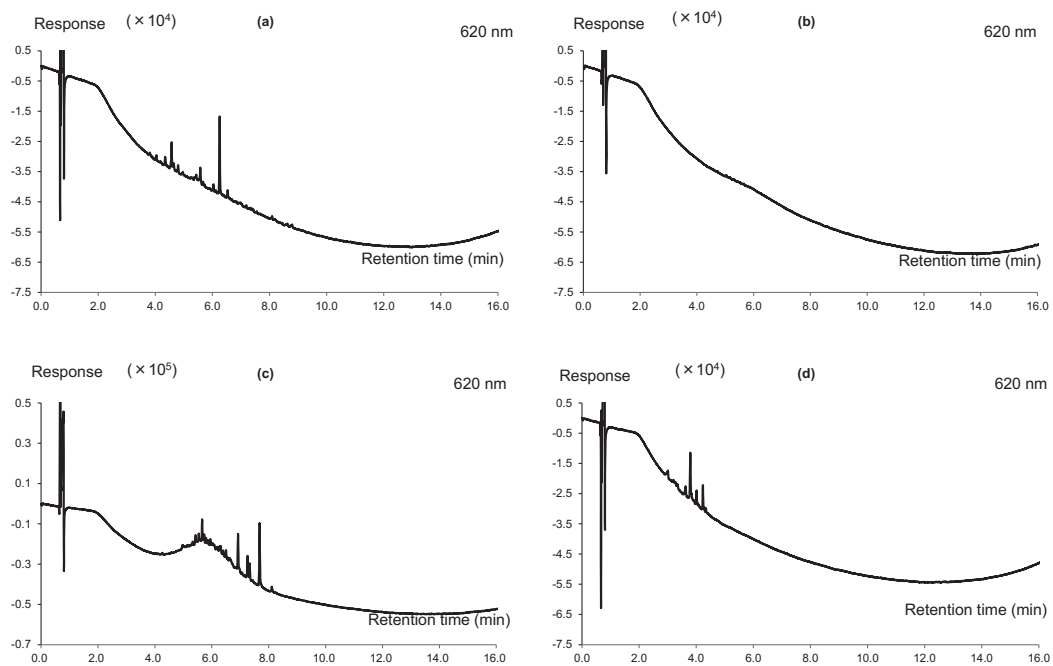


図 13. 酵素消化法により得られた溶液の HPLC クロマトグラム

(a)スピルリナ色素 1, (b)スピルリナ色素 2,
(c)クチナン青色素, (d)バタフライピー色素
検出波長は 620 nm で検出.

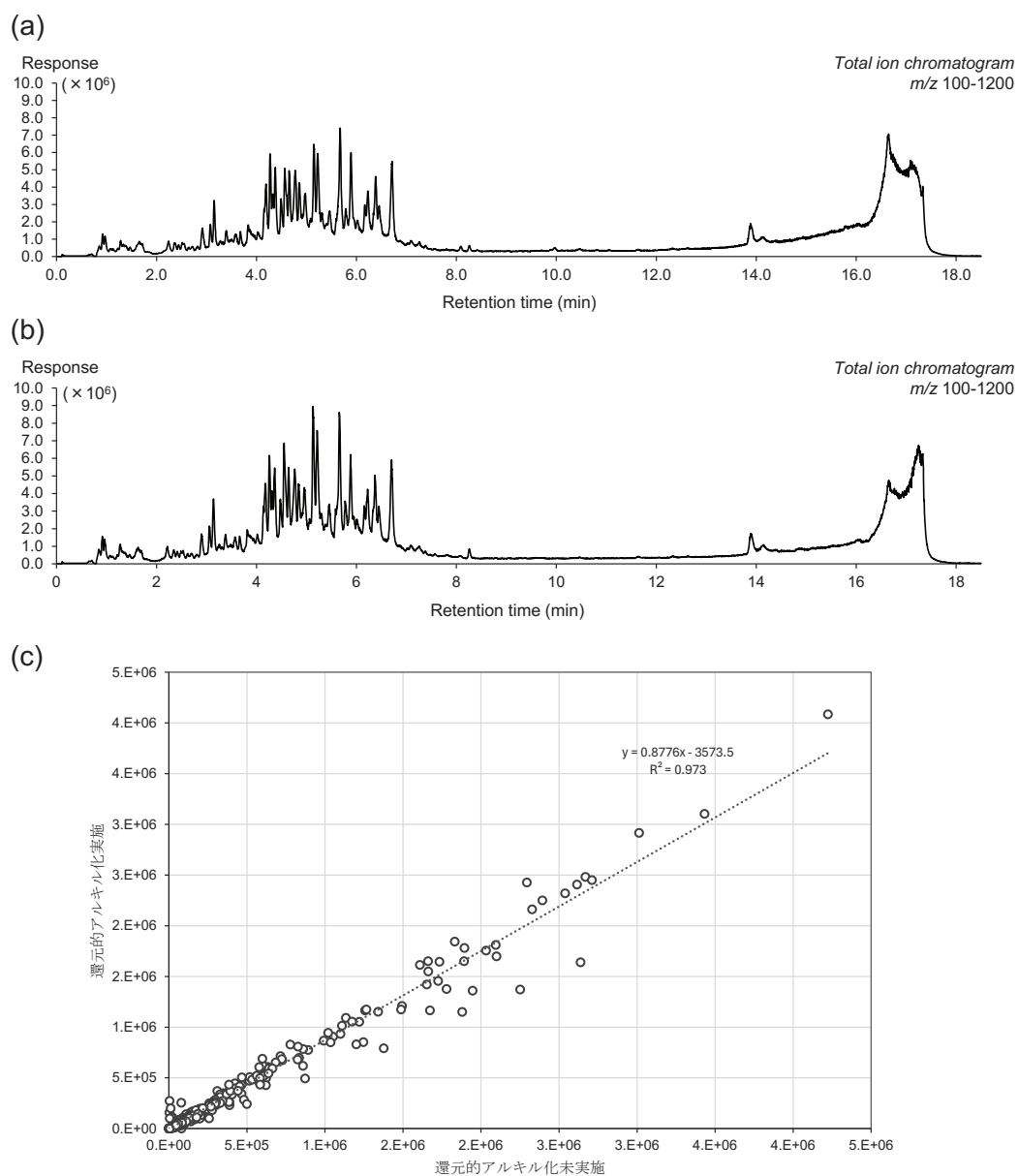


図 14. トリプシン消化断片のトータルイオンクロマトグラム及び MS 解析結果

- (a) 還元的方法あり
- (b) 還元的方法未実施
- (c) 各手法から得られたペプチド強度の相関

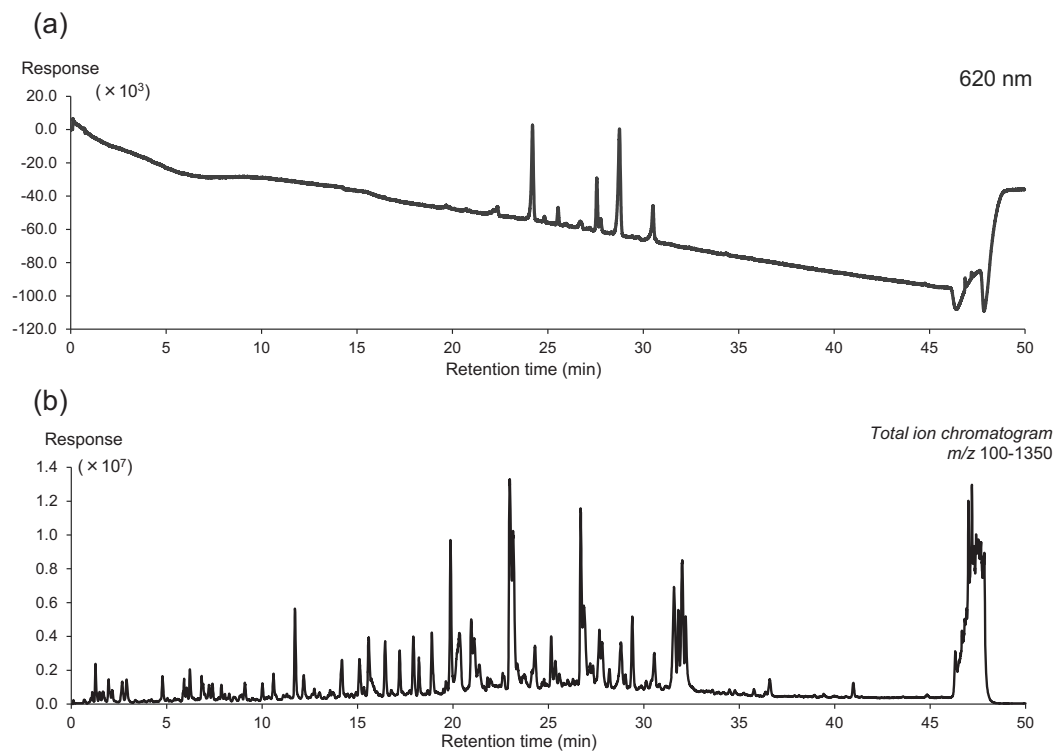


図 15. ペプチドシーケンス解析に供したクロマトグラム

(a) HPLC-UV のクロマトグラム(検出波長 620 nm)

(b) トータルイオンクロマトグラム

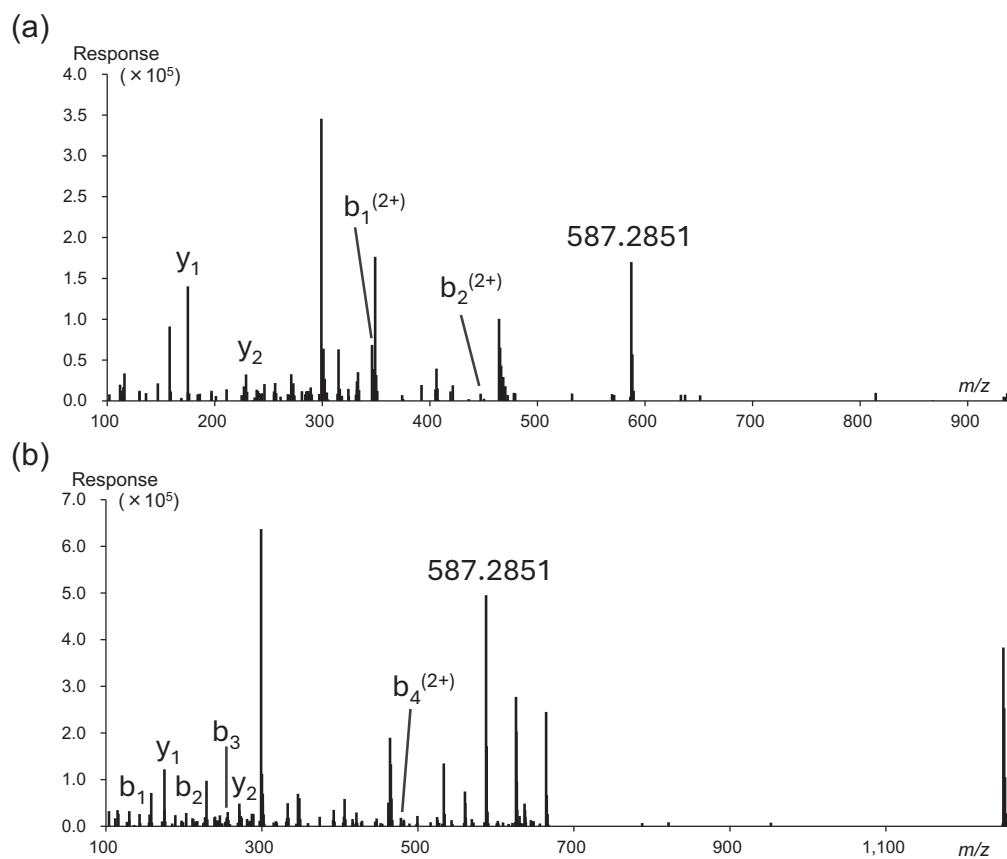


図 16. PCB 結合断片の MS/MS スペクトル

(a) $C_{PCB}LR$ 配列の MS/MS スペクトル

(b) $MAAC_{PCB}LR$ 配列の MS/MS スペクトル

MSDIAL (ver 230923.01)によりデコンボリューションを行い出力

