

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700817

研究課題名(和文)イカ表皮色素の化学構造の解明と着色料への応用に関する研究

研究課題名(英文)The study on the structure of pigments in the outer skin of squid

研究代表者

伊藤 裕才 (ITO, YUSAI)

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部・主任研究官

研究者番号：40435706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：スルメイカ表皮を塩酸/メタノール混合溶液に浸漬して赤色色素を抽出した。逆相LC/MSで分析した結果、黄色のオンモクローム色素であるxanthommatinが観測されたが赤色素は溶出しなかった。イオンペア試薬を添加した移動相による逆相HPLCで分析した結果、極大吸収が450nm～530nmの範囲の複数の色素が観測された。陽イオン交換および逆相カラムクロマト分画で得られた赤色素は水溶性を示し常温で安定であった。赤色素画分をUPLC/TOF-MSで分析した結果、複雑な組成であり分子量は約450-800Daの範囲であった。また分子内に硫黄分子の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The red pigments were extracted from the outer skin of Japanese flying squid *Todarodes pacificus* with HCl/methanol mixture solution. The reverse-phase LC-ESI-MS analysis of the extract showed the presence of xanthommatin and derivatives, yellow ommochrome pigments, in the extract, but red pigments were not eluted. The HPLC analysis with solvents added a ion-pair reagent revealed the presence of various pigments in the extracts. The wavelength of maximum absorbances of the observed pigments were in the range of 450 nm to 530 nm, indicating the extracts to be composed with various pigments containing yellow, red and red-purple color. The extract was partitioned by a positive ion-exchange and a subsequent reverse-phase chromatographies, which yielded hydrophilic red pigments. The UPLC-TOF-MS analysis of the red pigments indicated that the molecular weight of the pigments were between 450 and 800 Da and suggested the presence of sulfur in the pigment molecules.

研究分野：生活科学

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：天然着色料 色素 頭足類 オンモクローム

1. 研究開始当初の背景

「着色料」は、食品を美化し魅力を増すために使われる食品添加物の一群である。着色料はその基原によって合成着色料および天然着色料に分けられるが、近年「天然由来は安全」という認識から、消費者は合成着色料よりも天然着色料を好む傾向にある。しかしながら、天然着色料の基原生物は菌類から昆虫まで多岐に渡り、食材ではない生物が基原であることも多い。また多くの天然着色料は抽出物の状態であり、未同定の副成分が含まれている。そのため天然着色料を長期的に摂取することで、これら副成分が健康に影響を与える可能性が指摘されている。例として、カイガラムシ由来の既存添加物「コチニール色素」は、微量副成分である虫体由来たんぱく質にアレルギー抗原性が疑われている。またコチニール色素は昆虫由来であることから、消費者に忌避されることが多い。このような背景から、食経験が担保された食材を基原とした安全かつ安心な着色料の開発を求める声が高まってきている。

天然着色料の大半は植物由来であり、動物由来の着色料は少ない。上記のコチニール色素とカニやエビ由来のアスタキサンチンが最も汎用される動物性色素である。両色素の基原生物は無脊椎動物であるが、無脊椎動物の色素は多種多様であり不明な点が多く残されている。カニやエビと並び、日本人にとって極めて身近な食材であるイカやタコ等の頭足類は、表皮に赤色の色素胞を備えており、色素胞の伸縮と拡張で体表の色調を変化させ、擬態や仲間同士の信号に利用する。食材という観点からは、頭足類の色素胞の拡張は鮮度と密接に関係している。しかし色素の構造は未解明である。頭足類の表皮色素はオンモクローム類と考えられている。オンモクローム類はトリプトファンから生合成される軟体動物や節足動物の色素である。オンモクローム類は可視吸収スペクトルから「オマチン」「オミン」「オミジン」に分類される。昆虫の眼や鱗粉の色素である「オマチン」については、xanthommatin およびその類縁体が報告されている。一方で、イカやタコの赤紫色の表皮色素はオミンと考えられている。しかしながら、最初の報告から 50 年以上たった現在でも構造は不明のままである。

イカやタコの赤色の色調は、加熱調理しても維持されるため、色素は熱に対して安定と考えられる。また日本人のイカの消費量は世界全体のイカの水揚げ高の 3 割に相当し、日本の全ての水産物中で最も多い。イカの可食部は外套筋と腕部であるため、表皮は水産加工工場において大量に廃棄される。よって着色料製造の際の原料確保の心配は極めて少ないと考えられる。これらの観点から、イカやタコ等の頭足類の表皮色素は、天然着色料としての機能性と安全性に優れ、さらに産業化の可能性が高い素材と考えられる。

2. 研究の目的

「食の安全」の観点から、食品添加物の着色料においても出来るだけ天然由来そして食材として使用歴の長い食品由来のものが求められている。そこで本研究は、赤色～紫色を呈するイカの表皮色素を新しい着色料として利用すべく、色素の化学的性質および有効性に関する知見を高めることを目的とした。特に未解明のままである表皮色素の化学構造の情報を得ることを第一の目的とした。

3. 研究の方法

試料：水産加工会社から分譲されたスルメイカ (*Todarodes pacificus*) の冷凍表皮を試料とした。この表皮は加工場でイカ製品の製造時に発生した廃棄物である。また研究代表者自身が市場で購入した新鮮なスルメイカから表皮を調整し試料の一部とした。

色素の抽出：冷凍表皮を解凍後、水で洗浄し、アセトンおよびメタノールに浸漬して表皮表面の粘液物質および脂溶性物質を除去した。続いて、試料を塩酸/メタノール(2:98)混合溶液に浸漬し、ゆるやかに攪拌しながら 1 時間色素の抽出を行った。抽出液から表皮試料を除去後、5000rpm で 10 分間遠心分離を行い残渣を除去した。その結果、濃赤色の粗抽出液を得た。

粗抽出液の LC/MS 分析：得られた粗抽出液を以下の条件を用いて逆相カラムによる LC/MS 分析を行った。

カラム：Cosmosil 5C18-MSII (4.6 i.d. × 250 mm, nacalai tesque 社製)、移動相：A 液=0.1%ギ酸水溶液、B 液=0.1%ギ酸入りアセトニトリル溶液、グラジエント条件：B 液の濃度 10% (2%/min) 70%、カラム温度：40℃、流量：0.5ml/min、試料注入量：10μl、検出器：Photo diode array(検出波長 100~600 nm)、ESI-MS 条件：キャピラリー電圧：3kV、コーン電圧：30 V、ソース温度：120℃、脱溶媒温度：350℃、脱溶媒ガス流量：400 L/h、コーンガス流量：50 L/h。

粗抽出液の分画：粗抽出液(塩酸/メタノール溶液)を 0.5N 水酸化ナトリウム水溶液で中和し、析出した赤色色素を遠心分離によって分離後、凍結乾燥した。得られた個体色素について溶媒に対する溶解を確認した。

これとは別に、色素粗抽出液(塩酸/メタノール溶液)を前処理用カートリッジ Oasis MCX (6cc, Waters 社製)に負荷し、メタノール、メタノール/25%アンモニア水 (25:1) 混合溶液、0.5M 水酸化ナトリウム水溶液で溶出した。さらに 0.5M 水酸化ナトリウム水溶液による溶出画分を Sep-Pac ODS カートリッジ(6cc, Waters 社製)に負荷し、連続的にメタノール、塩酸/メタノール(98:2)溶液、または 0.5%トリフルオロ酢酸含有メタノール溶液および、1%トリフルオロ酢酸含有メタノール溶液で溶出した。

粗抽出液のイオンペア試薬を用いた HPLC

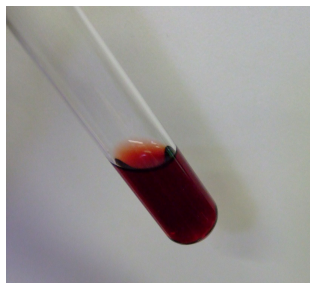
分析：粗抽出液を溶媒にイオンペア試薬を加え、以下の条件で HPLC 分析した。

カラム：Cosmosil 5C18-MSII (4.6 i.d. × 150 mm, nacalai tesque 社製), 移動相：A 液=20mM リン酸二水素ナトリウム/10mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム (pH2.1) 混合液, B 液=アセトニトリル/A 液 (8:2), グラジエント条件:B 液の濃度 15% (3%/min) 100%, カラム温度：40, 流量：0.5ml/min, 試料注入量：10 μ l, 検出器：PDA (100~600 nm)

色素画分の UPLC 分析：得られた色素画分を以下の条件で UPLC 分析を行った。カラム：ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1 i.d. × 50 mm, Waters 社製), 移動相：A 液=0.1% ギ酸入り水, B 液=0.1% ギ酸入りアセトニトリル, グラジエント条件:B 液の濃度 0% (4%/min) 60%, 流量：0.1 mL/min, カラム温度：40, 試料注入量：0.1 μ L, 検出器：PDA (190-600 nm), Tof-MS 条件：正イオンモード, キャピラリー電圧：3.0 kV, コーン電圧：30 V, ソース温度：120, 脱溶媒温度：450, 脱溶媒ガス流量：800 L/h, コーンガス流量：50 L/h

4. 研究成果

イカ表皮の表面には多くの色素胞が存在する。収縮状態の色素胞は、暗赤色または濃赤紫色の暗点として観察される。解凍したイカ表皮を水、アセトン、メタノールで順次洗浄した。このとき色素の漏出は一切観察されなかった。続いて塩酸酸性のメタノール溶



液に浸漬した。その結果、ただちに色素の溶出が始まり、浸漬から1時間後には溶液は赤ワインのような濃赤色に染まった (左写真)。このことから表皮の色素成分は塩基性物質であることが強く示唆された。続いて、粗抽出液を中和した後に水を加え、減圧下で有機溶媒を留去した。その結果、ほとんどの色素成分は不溶化して沈殿した。沈殿を遠心分離し凍結乾燥した後、水、メタノール、アセトニトリル、ピリジン、アセトン、酢酸エチルへの溶解を試みたが、沈殿色素はいずれの溶媒にも溶解しなかった。このようにイカ表皮の色素は中性の水溶液および溶媒に溶解しないことが確認された。

得られた赤色の粗抽出液をギ酸入りの含水アセトニトリルを移動相とした逆相 LC/MS を用いて分析を行った。その結果、比較的高極性の領域に、黄色色素と考えられるピークを観測した (図1)。2つの主ピークは共に 444 nm 近辺に極大吸収を示した。また ESI-MS 分析の結果、ピーク1は正イオンモードで m/z 424, 負イオンモードで m/z 422

にイオンピークを観測した (図2)。ピーク2は正イオンモードで m/z 380, 負イオンモードで m/z 378 にイオンピークを観測した (図2)。これらの結果から、ピーク1はオンモクローム類の xanthommatin (分子量 423), ピーク2は decarboxyxanthommatin (分子量 379) であることが強く示唆された。しかしながらカラムに注入した赤色素成分は、100% アセトニトリルを移動相としたイソクラティック条件でもカラムから溶出されなかった。

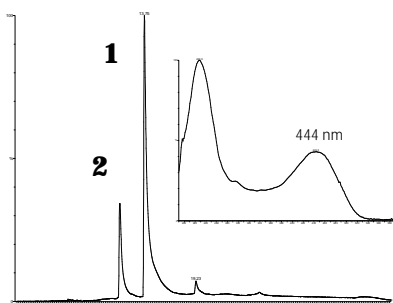


図1：粗抽出液の逆相クロマトグラム (検出波長：450 nm) およびピーク1の紫外可視光部吸収スペクトル

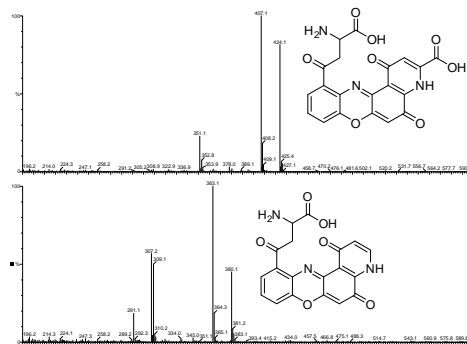


図2：ピーク1 (上：xanthommatin) 及び2 (下：decarboxyxanthommatin) の ESI-MS スペクトル (正イオンモード)

粗抽出液 (塩酸/メタノール溶液) を陽イオン交換と逆相の両方の性質を併せ持つ前処理カートリッジ Oasis MCX に負荷した。その結果、色素のすべてがカートリッジの上部に保持された。カートリッジを水およびメタノールで洗浄後、メタノール/アンモニア水混合液で溶出を行ったところ、黄色色素が溶出された。続いて 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液で溶出した結果、赤紫色の色素が溶出し、カートリッジ中に色素は残らなかった。メタノール/アンモニア水混合液で溶出した画分は 450 nm 近辺に極大吸収を示したため、xanthommatin 類と考えられた。そこで LC/MS 分析を行った結果、上記と同様に xanthommatin および decarboxyxanthommatin が観測された。既報において xanthommatin は還元型で赤色を示すとされるので、中和後にアスコルビン酸を過剰に加えた結果、赤橙

色へと変化した，この溶液は 500 nm に極大吸収が観測された。これらの結果から，弱アルカリ性のメタノール/アンモニア水混合液によって，xanthommatin 類が先に溶出したと考えられた。

強アルカリ性の 0.5M 水酸化ナトリウム溶液で溶出した赤紫色の画分は 516 nm に極大吸収が観測された。観測された吸収波長は上述の xanthommatin の極大吸収波長と明確に異なり，またアスコルビン酸の添加による色調変化も観察されなかった。そのため本画分の赤紫色素はオマチン類ではなくオミン類と推測された。本画分を塩酸で中和後，前処理用 C18 カートリッジに負荷し，水，メタノール，塩酸/メタノール混合溶液の順で溶出した。その結果，赤紫色素は塩酸/メタノール混合溶液で溶出された。塩酸/メタノール混合溶液の代わりに 1%トリフルオロ酢酸を含むメタノールでも赤紫色素が溶出した。赤紫色素画分を減圧濃縮で乾固したが，中性の水および有機溶媒に溶解しなかった。またこの赤紫色素は，加工場から分譲された試料よりも，市場で購入した生鮮試料により多く含まれていた。これはスルメイカの捕獲後の保存中に色素成分が変化することを示唆した。

塩酸/メタノール溶液に溶解した赤紫色素画分をギ酸酸性の含水アセトニトリル溶媒を移動相とする逆相 HPLC で分析を試みたが，その結果と同様に赤紫色素が溶出されることはなかった。これはギ酸の酸性度では色素が移動相に溶解せずカラムの注入部に保持されたままになっているためと考えられる。

オンモクローム類の分析法として，移動相にイオンペア試薬を添加した HPLC 分析が報告されている。そこで陰イオンペア試薬として 1 - ヘプタンスルホン酸を添加した逆相 HPLC による分析を行った。その結果，黄色～赤色と考えられる複数の色素が溶出された(図 3)。観測された各色素の極大吸収波長は 450～510 nm であった。510nm に極大吸収を示すピークはオミン類ではないかと推測された。この結果から，イカ表皮の色素は複数の色素による複雑な組成で成り立っていることが明らかとなった。

オミン類と考えられる紫色素を大量に精製すべく，加工工場由来の試料を塩酸/メタノール混合溶媒で抽出した後，粗抽出液にバッチ法で陽イオン交換樹脂 SP に色素を吸着させた。その後，樹脂をメタノール/アンモニア水混合液および 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液で順次処理した。上澄み液と樹脂はデカンテーションで分離した。メタノール/アンモニア水混合液には xanthommatin 類と考えられる黄色色素が溶出した。0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液では紫褐色の溶液が得られた。この溶液を C18 樹脂オープンカラムに負荷し，水，メタノール，塩酸/メタノール混合溶媒で溶出させた。その結果，メタノール画分に赤橙色の色素が大量に溶出し，目標の紫色素は塩酸/メタノール混合溶媒で少

量だけしか溶出しなかった。

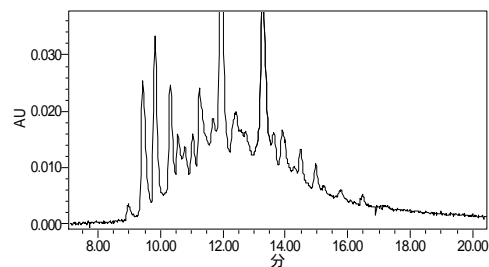


図 3：粗抽出液のイオンペア試薬を移動相に添加した逆相クロマト図（検出波長：500 nm）

興味深いことにメタノールで溶出した赤橙色色素は常温で安定であり色調に変化はなかった。さらに赤橙色色素を含む画分から有機溶媒を減圧留去した結果，色素は水溶性を示した。そこで水に溶解した赤橙色色素試料を逆相 UPLC/TOF-MS で分析した。その結果，移動相にイオンペア試薬を用いたクロマト(図 3)と同様の複雑な色素の組成が観測された。色素群の極大吸収は 450nm から 540nm まで幅広く観測され，黄色から紫色まで種々の色素の混合物であることが確認された。観測された 2 つの主ピークは極大吸収がそれぞれ 518nm，500nm であった。これら 2 つのピークについて正イオンモードの TOF-MS 分析を行った結果， m/z 759， m/z 468 に主イオンピークが観測された。さらに精密質量解析を行い，元素組成を予想した結果，両物質ともに硫黄分子が含まれているが強く示唆された。

まとめ

- ・イカ表皮色素は強塩基性の物質であった。
- ・黄色色素としてオマチン類の xanthommatin および decarboxyxanthommatin が含まれていることが確認された。
- ・表皮の色素群は黄色から赤紫色の複数の色素で構成されており，各色素の極大吸収波長が 450～540nm と幅広く観測された。色素群の分子量は約 350～800Da 程度であった。
- ・赤紫色色素は ommin 類と考えられた。しかし精製中に赤橙色に変化した可能性が考えられた。今後，この点を明らかにし，さらなる単離精製法を構築する必要がある。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 裕才 (ITO, Yusai)

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部・主任研究官

研究者番号：40435706