



〈短報〉

## 濃縮液体かつおだし中に見られたチアミン-リン酸カルシウム化合物の検出とその形成の検討

根來宗孝<sup>1)</sup>、森本雅子<sup>1)</sup>、澤村弘美<sup>2)</sup>、榎原周平<sup>1)</sup>、渡邊敏明<sup>1),2),3)</sup>、前川隆嗣<sup>3)</sup>

### Detection of thiamine-calcium-phosphorus complex in condensed bonito stock (Katsuo-Dashi) and examination of its formation process

Munetaka Negoro<sup>1)</sup>, Masako Morimoto<sup>1)</sup>, Hiromi Sawamura<sup>2)</sup>, Shuhei Ebara<sup>1)</sup>,  
Toshiaki Watanabe<sup>1),2),3)</sup>, Takatsugu Maekawa<sup>3)</sup>

**Summary** The existence of several complexes of thiamine and inorganic (copper, cobalt, zinc and so on) have been known, but a thiamine-calcium-phosphorus complex has not yet been elucidated. In this study, we found the thiamine-calcium-phosphorus complex in precipitates formed when bonito stock (Katsuo-Dashi) was condensed. Therefore, we examined the formation process of the thiamine-calcium-phosphorus complex and confirmed that the complex was formed by acid-base reaction before the addition of thiamine to calcium pyrophosphate. The synthesized thiamine-calcium-phosphorus complex contains approximately 1,300 times as much thiamine as the thiamine content analyzed in the precipitate of the concentrated bonito stock.

**Key words:** Thiamine, calcium, phosphorus, precipitate, thiamine-calcium-phosphorus complex

#### I. 緒言

金属の化合物には、*in vivo*および*in vitro*で細胞障害性薬剤として抗がん作用を有する錯体が知られている。例えば遷移金属である白金 (Pt) を中心金属、配位子としてアミンと塩化物イオ

ンによって構成されるCisplatinは、抗がん剤として広く使われており、とくに精巣がんや卵巣がんなどに有効である。しかし今日副作用や毒性の低い医薬品の開発が進められている<sup>1)</sup>。近年合成された銅 (I) および銅 (II) と水溶性ビタミンであるチアミンを構成因子として応用し

<sup>1)</sup>大阪青山大学健康科学部健康栄養学科  
〒562-8580大阪府箕面市新稲2-11-1

<sup>2)</sup>兵庫県立大学環境人間学部  
〒670-0092 兵庫県姫路市新在家本町1-1-12

<sup>3)</sup>前川TSH研究所、マエカワテイスト(株)  
〒670-0996 兵庫県姫路市土山6-4-1

<sup>1)</sup> Department of Health and Nutrition Science, Faculty of Health Science, Osaka Aoyama University, Minoh, Osaka 562-8580, Japan

<sup>2)</sup> School of Human Science and Environment, University of Hyogo, Himeji, Hyogo 670-0092, Japan

<sup>3)</sup> Maekawa TSH Laboratory, Maekawa Taste Co., Ltd, Himeji, Hyogo 670-0996, Japan

連絡先：根來宗孝

大阪青山大学健康科学部健康栄養学科

Tel: +81-72-737-6854 Fax: +81-72-722-5190

E-mail: m-negoro@osaka-aoyama.ac.jp

受付日：2022年12月1日

採択日：2023年2月18日

た化合物は、Cisplatinよりも高い抗がん作用をもっていることが示された<sup>2)</sup>。

これまでチアミン・無機化合物の存在は数種類が知られており、文献的には、チアミンやその誘導体（オキシチアミンoxythiamine、チアミン二リン酸TDPなど）と銅（Cu）、モリブデン（Mo）、金（Au）などの多くの重金属（Hg、Cd、Zn、Pt、Co、Mn、Rh）との化合物が報告されている<sup>2,8)</sup>。これらは、チアミンを利用して重金属をチアミン要求性臓器や細胞に輸送するドラッグデリバリーシステムとして合成されてきた。しかしながら、チアミンとリン（P）およびカルシウム（Ca）などから成る化合物については、特に食品中の沈殿物としてはこれまでに確認されていない。本研究は、濃縮液体だし中に見られた沈殿物中に、チアミンに加えリン（P）およびカルシウム（Ca）の2種類の無機質を含む化合物の存在を確認したため報告する。しかしながら本現象は、外部からの成分混入により発生したものではないことを明らかにするため、濃縮液体だし中に確認されたチアミン-リン酸カルシウム沈殿物が、実験的にリン酸カルシウムを用いて、チアミン添加により合成しうるのか検討した。

## II. 方法と材料

### 1. 濃縮液体だし中の沈殿物の同定

実験に供した試料は、兵庫県にある食品メーカーの工場で生産された「濃縮液体だしA」および「濃縮液体だしB」で、生産後室温で保存していたものである。原料はサバ、コンブ、かつおで、それぞれBrix 52%、28%および塩分濃度3%、11%である。これらの濃縮液体だしは、加工用原料として使用されている。Brix値（%）は、食品中に含まれる糖質および食塩など、いわゆる可溶性固形成分の総含有量を表したものである。本研究では、「濃縮液体だしA」中に見られた白色の沈殿物を遠心分離により回収した。

まず沈殿物について真空乾燥を行い、乾燥した沈殿物をフーリエ変換赤外分光法（FT-IR）（サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）、東京: Nicolet iS50+iN10）、走査電子顕

微鏡（日本電子株式会社、東京: 電界放出形分析走査電子顕微鏡/JSM-7001F）による元素分析、およびポストカラム誘導体化法による高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（（株）島津製作所、京都市: LC-20AT）によって解析した<sup>9)</sup>。なおHPLC試料としては、真空乾燥した沈殿物をあらかじめ希塩酸処理したものを供試した。HPLCのカラムは、前処理カラムとして（株）大阪ソーダ（大阪市）: CAPCELL MF SCX S 5:  $\Phi 4.6 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 、粒子径（ $5 \mu\text{m}$ ）、分析カラムとして（一財）化学物質評価研究機構製（大阪市）: L-column ODSCX S  $\Phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ 、粒子径（ $5 \mu\text{m}$ ）を使用した。測定条件としては、カラム温度:  $40^\circ\text{C}$ 、移動相:  $0.01 \text{ mol/L}$  リン酸二水素ナトリウム溶液 $0.15 \text{ mol/L}$ 過塩素酸ナトリウム緩衝液（pH 2.2）及びメタノールの混液（95: 5）、流量:  $1.0 \text{ mL/min}$ 、蛍光励起波長:  $375 \text{ nm}$ 、蛍光測定波長:  $440 \text{ nm}$ 、ポストカラム: 反応試液:  $0.03\%$  フェリシアン化カリウム含有 $15\%$  水酸化ナトリウム溶液、反応液流量:  $0.5 \text{ mL/min}$ 、反応温度:  $40^\circ\text{C}$ として測定した。使用した標準液は、チアミン塩酸塩  $0.002 \mu\text{g/mL}$ 、ヒドロキシエチルチアミン塩酸塩  $0.002 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ含み、インジェクション量は $20 \mu\text{L}$ である。

### 2. チアミン-リン酸カルシウム化合物の合成

次にリン酸カルシウム化合物を用いて、チアミン添加によりチアミン-リン酸カルシウム化合物が形成されるのか試みた。化合物の調整方法は以下のように行った。まず、①ピロリン酸カルシウム $0.15 \text{ g}$ 、チアミン塩酸塩 $0.2 \text{ g}$ に精製水 $600 \mu\text{L}$ 、HCl  $1,000 \mu\text{L}$ を加えてピロリン酸カルシウムを完全に溶解した。②この溶液をガラス板に $50 \mu\text{L}$ ずつ間隔をあけて分注し、飽和した水酸化カリウム溶液を $20 \mu\text{L}$ ずつ滴下すると沈殿物が生じた。③この沈殿物を回収し、 $20,400 \times \text{g}$ ,  $10 \text{ min}$ 遠心分離した沈殿物をチアミン-リン酸カルシウム化合物として解析した。④さらに薄層クロマトグラフィー（TLC）（メルク株式会社、（ドイツ）TLC Silica gel 60, 展開溶媒 $9 \text{ mmol/L}$  酢酸アンモニウム、 $70\%$ メタノールにより沈殿物を解析し、紫外線を照射して移動度を確認した。なお、すべての試薬は富

士フィルム和光純薬工業株式会社製（大阪市）の特級品を使用した。

### Ⅲ．結果および考察

#### 1. 濃縮液体だし中の沈殿物の同定

Fig. 1は濃縮液体だしボトルに認められた沈殿物である。この濃縮液体だしから回収した沈殿物を乾燥後、まずFT-IRによる解析を行い（Fig. 2）、ライブラリーと照合した結果、Georgia State Crime Lab Sample Libraryからヒット率55.62%でチアミン吸光パターンを見出した（Table 1）。濃縮液体だしの成分として外部から成分混入がないことを前提とすると、Table 1中のヒット率59.45%の1,4-Anhydroerythritol やヒット率47.51%の3-(2-Hydroxyethylamino)-1-propanolは溶液中には含まれないと予測した。次に、この沈殿物の電子顕微鏡による元素分析の結果、元素の構成比（Wt%）がC: 5.27、O: 46.53、Ca: 26.73、P: 21.47 から、炭素、酸素、カルシウムおよびリンの存在を確認した。



Fig. 1 The precipitate detected at the bottom of the bottle in the condensed bonito stock.

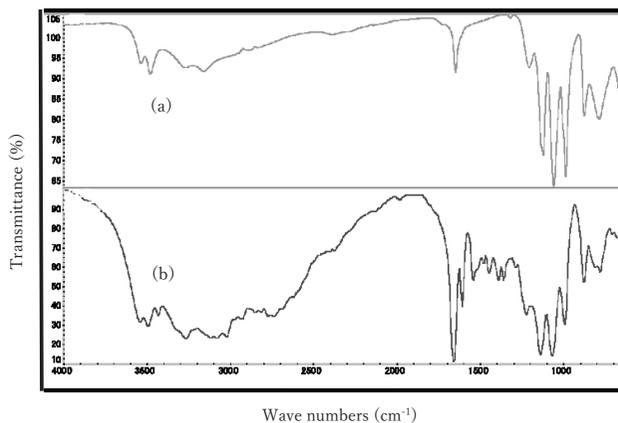


Fig. 2 Comparison of the two sequential fourier transform infrared spectroscopy spectrum.  
 (a) The spectrum of the precipitate in the condensed bonito stock.  
 (b) The spectrum of thiamine-HCl spectrum from the library.

Table 1 The researched results of the fourier transform infrared spectroscopy library matched to the precipitate found at the bottom of the bottle in the condensed bonito stock.

hit (%)	Chemicals	Library
59.45	1,4-Anhydroerythritol, 95%	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II
55.62	THIAMINE HCL IN KBR	Georgia State Crime Lab Sample Library
47.51	3-(2-Hydroxyethylamino)-1-propanol	HR Aldrich FT-IR Collection Edition II

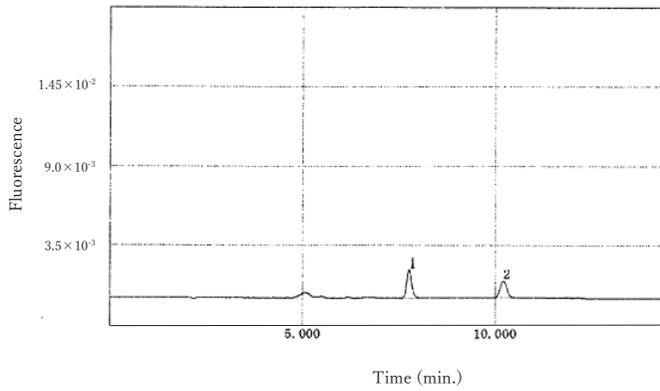


Fig. 3 The separation profile of the two thiamine standards from the high-pressure liquid chromatography.  
Peak No.1 : VB<sub>1</sub> (thiamine)  
Peak No.2 : HET (hydroxyethyl thiamine)

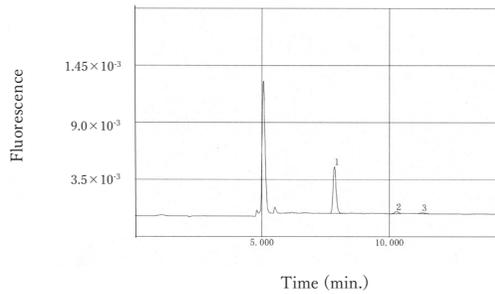


Fig. 4 The separation profile of the precipitate in the condensed bonito stock from the high-pressure liquid chromatography.  
Peak 1 : VB<sub>1</sub> (thiamine)  
Peak 2 : HET (hydroxyethyl thiamine)

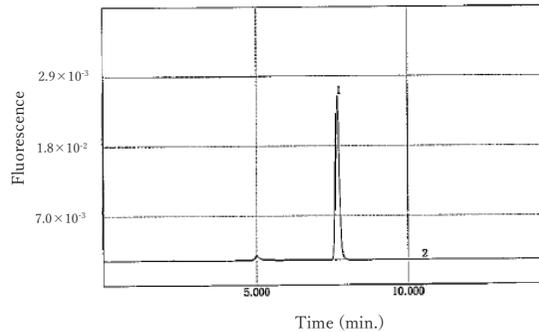


Fig. 5 The separation profile of the synthesized thiamine-calcium-phosphorus complex from the high-pressure liquid chromatography.  
Peak No.1 : VB<sub>1</sub> (thiamine)  
Peak No.2 : HET (hydroxyethyl thiamine)

またHPLCによるチアミン検出方法（日本食品分析方法）により、沈殿物中にチアミンの存在を確認した（Fig. 3、Fig. 4）。沈殿物中に含まれるチアミンの含有量としては0.06 mg/100 gであった。しかし、Fig. 4に示すとおり、RT 5 min付近に比較的高いピークが検出されたものの、成分の同定には至らなかったため、濃縮液体だしの沈殿物に含まれるチアミンは他のだし成分によって置き換えられたリン酸カルシウム化合物の可能性はある。

## 2. チアミン-リン酸カルシウム化合物の合成

チアミン添加によるリン酸カルシウム化合物の合成を試みたところ、チアミン化合物の形成が認められた。この沈殿物の電子顕微鏡による元素分析結果から、炭素、酸素、カルシウムおよびリンに加え、窒素、硫黄、カリウムおよび塩素の元素の構成比（Wt%）は、C: 16.95、O: 22.18、Ca : 7.03、P: 2.75、N: 3.31、S: 1.86、K: 40.68、Cl: 5.25であることが確認された。

合成した化合物を用いてHPLCによるチアミン検出方法（日本食品分析方法）により、沈殿物に含まれるチアミン含有量（80 mg/100 g）を確認した（Fig. 5）。合成したチアミン-リン酸カルシウム化合物には、濃縮液体だしの沈殿物に含まれるチアミン含有量と比較すると1,300倍程度のチアミンが含まれることが明らかとなった。

本研究において見出したチアミン-リン酸カルシウム化合物は、薄層クロマトグラムにより単一成分として分離（ $R_f = 0.70$ ）され、合成の際に使用したチアミン塩酸塩（ $R_f = 0.23$ ）と比べて移動度が大きくなった（Fig. 6）。従ってこのチアミン-リン酸カルシウム化合物の展開溶媒中のシリカゲル担体に対する疎水性は、チアミン塩酸塩と比較するとチアミンがリン酸カルシウムと結合したことにより大きくなると考えられた。本研究では、沈殿物の再現性を確認するために、チアミン-リン酸カルシウム合成の検討を試みたがペプチドを含有したリン酸カルシウムナノ粒子そのものを合成することにより、たんぱく質を吸着する材料とする素材開発のためのリン酸カルシウム合成が行われている<sup>10</sup>。またリン酸カルシウム化合物として、ヒドロキシアパタイトが存在し、このナノ粒子をドラッグ

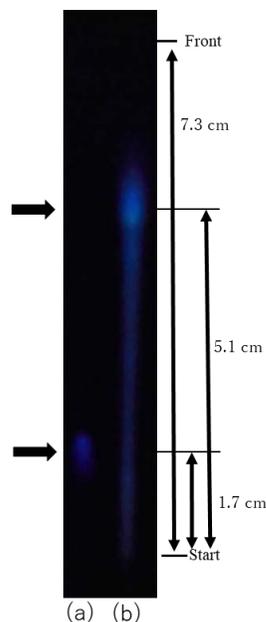


Fig. 6 UV radiation chromatogram of the thiamine-HCl (a) and the synthesized thiamine-calcium-phosphate precipitate (b) (TLC plate Si 60, 9 mmol/L Ammonium acetate, 70% methanol).

デリバリーシステムやタンパク質キャリアなどとして利用することも進んでいる。本研究において合成したチアミン-リン酸カルシウム化合物には重量比で0.08%のチアミンが含まれることから、チアミンを含むヒドロキシアパタイトとして新たな素材を提供できる可能性もある。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

## 文献

- 1) Zhang CX, Lippard SJ: New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 7: 481-489, 2003.
- 2) Brandão P, Correia-Branco A, Silva C, Martel F: Development of novel Cu (I) compounds with vitamin B<sub>1</sub> derivative and their potential application as anticancer drugs. *Inorg Chim Acta*, 487: 287-294, 2019.
- 3) Casas JS, Castellano EE, Couce MD, Ellena J, Sánchez A, Sordo J, Taboada C: Zinc (II), cadmium (II) and mercury (II) complexes of the vitamin B<sub>1</sub> antagonist oxythiamine. *J Inorg Biochem*, 100: 124-132, 2006.

- 4) Hu N-H, Liu W, Aoki K: Thiamine as a cationic host in anion coordination chemistry. Crystal structures of five anion salts of thiamine monophosphate. *Bull Chem Soc*, 73: 1043-1052, 2000.
- 5) Hu N-H, Aoki K, Adeyemo AO, Williams GN: Metal ion and anion coordination in the thiamine-[Pt<sup>II</sup>(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> system. Structures of a metal complex, Pt(thiamine)(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, and two salts, (H-thiamine)[Pt(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>·H<sub>2</sub>O and (thiamine monophosphate) 2[Pt(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>·H<sub>2</sub>O. *Inorg Chim Acta*, 325: 9-19, 2001.
- 6) Das B, Baruah JB: Dipicolinato complexes of cobalt (II), copper (II) and zinc (II) with thiamine dications. *Inorg Chim Acta*, 372: 389-393, 2011.
- 7) Dodi K, Louloudi M, Malandrinos G, Hadjiliadis N: Metal complexes with 2-( $\alpha$ -hydroxy-benzyl)thiamine pyrophosphate (HBTPP). Models for metal binding of thiamine enzymes. *J Inorg Biochim*, 73: 41-47, 1999.
- 8) Tabrizi L, Abyar F: Conjugation of a gold (III) complex with vitamin B<sub>1</sub> and chlorambucil derivatives: anticancer evaluation and mechanistic insights. *Metallomics*, 12: 721-731, 2020.
- 9) 食品衛生検査指針 理化学編, 日本食品衛生協会, 2005.
- 10) Nagata F, Yamauchi Y, Tomita M, Kato K: Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles and their protein adsorption behavior. *J Ceram Soc Jpn*, 121: 797-801, 2013.