

高速液体クロマトグラフィーによる市販食品中の天然着色料の分析

中 島 和 雄*, 広 門 雅 子*, 嶋 村 保 洋*,
小 沢 秀 樹*, 木 村 圭 介*, 安 田 和 男*

Analysis of Natural Colours in Commercial Foods by High-Performance Liquid Chromatography

KAZUO NAKAJIMA*, MASAKO HIROKADO*, YASUHIRO SHIMAMURA*,
HIDEKI OZAWA*, KEISUKE KIMURA* and KAZUO YASUDA*

Keywords : 天然着色料 natural colours, 高速液体クロマトグラフィー-HPLC, アントシアニン系色素 anthocyanins colour, ラック色素 lac colour, コチニール色素 cochineal colour, クチナシ黄色素 gardenia yellow colour, ベニバナ黄色素 carthamus yellow colour, ウコン色素 turmeric oleoresin colour, ベニコウジ色素 monascus colour

はじめに

天然着色料は、消費者の自然志向や食品加工技術の開発を背景に、多様な食品に、高頻度で使用されている。天然着色料は、複数の色素成分から成り、不安定で分解しやすいものが多い、また、原料の産地により、その成分組成が異なる場合がある。

天然着色料の高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）による分析法は数多く報告¹⁻⁵⁾されているが、複数の色素を同一条件で分析する方法は、これまで報告されていない。市販食品中に着色料が添加されているかどうかを検討するには、同一条件で、数多くの着色料を検出できる分析法が必要である。そこで、本研究では、HPLCを用い、天然着色料の一斉分析法を検討し、併せて食品中のそれらについて分析したところ若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 標準品

- 1) アントシアニン系色素：ハイビスカス色素、ポイセンベリー色素、ブラックカトン色素、エルダーベリー色素、ムラサキトウモロコシ色素、ブドウ果皮色素、アカキャベツ色素、及びムラサキイモ色素は、三栄源エフ・エフ・アイ(株)製を標準品として用いた。
- 2) キノン系色素：コチニール色素、及びラック色素

(いずれも関東化学(株)製を用いた)

- 3) その他：クチナシ黄色素、ベニバナ黄色素、ウコン色素、及びベニコウジ色素 (いずれも関東化学(株)製を用いた)

2. 試薬

すべて試薬特級品を用いた。

固相抽出カートリッジ：Mega Bond Elut HF C18 (1 g, バリアン社製)を用いた。

3. 試料

市販食品として、清涼飲料水、ゼリー、飴を用いた。

4. 装置

HPLC装置は、日本分光工業(株)製ガリバーシステム、ポンプ：PV-1580、フォトダイオード検出器（以下PDAと略す）：MD-1515、及び(株)島津製作所製SCL-10Aシステム、ポンプ：LC-10AT、紫外可視検出器：SPD-10AV

5. HPLCの分析条件

カラム：Develosil HG-5 (4.6 m i.d. × 250 mm, 5 μ m, 野村化学(株)製), 移動相：A液；0.05%トリフルオロ酢酸・アセトニトリル溶液 (95：5), B液；アセトニトリル溶液, グラジエント条件：0 min (A液90%・B液10%) → 20min (A液70%・B液30%) → 30min (A液40%・B液60%) → 50min (A液40%・B液60%), カラム温度：40℃, 流速：0.7ml / min, 注入量：10 μ l, 測

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

定波長：250～650nm, 430nm, 530nm

6. 標準溶液の調製

各天然着色料標準品20mgとり0.1mol/L塩酸・メタノール（1：1）混液20mlに溶解し、それぞれを標準溶液とした。

7. 試料溶液の調製

試料5～25gを秤量し、0.1mol/L塩酸・メタノール（1：1）混液50mlを加えてホモジナイズした後、ろ過した。そのろ液を減圧濃縮後、Bond Elut C18を用い、色素を吸着させ、蒸留水100mlで洗浄後、0.1mol/L塩酸・メタノール（1：9）混液100mlで溶出し、減圧濃縮後全量を1mlとした。この液をHPLC用試料溶液とし、上記HPLC条件で測定した。

結果及び考察

1. HPLC条件の検討

天然着色料のHPLCによる一斉分析法について、これまでの分析法¹⁻⁵⁾をもとに、ODS系カラムを用い、できるだけ多くの色素が分析できる移動相についての条件を検討した。アントシアニン系色素は、酸性溶液以外では不安定であることが知られており、HPLCによる分析でも、移動相の液性が酸性から中性に近づくに従い、ピークがブロードになりピーク間の分離が悪くなった。ラック色素は、移動相にクエン酸緩衝液（pH 3.6）・メタノール混液を用いたものが、クチナシ黄色素は、水・アセトニトリル混液を用いたものが報告^{1,2)}されている。しかし、これらは、この他の液性の条件でも、保持時間は変化するが、その色素を確認するための特徴的なクロマトグラムのパターンが得られた。そこで、酸性の移動相による条件で検討した。清水ら⁴⁾がアントシアニンの分析で報告している、0.05%トリフルオロ酢酸とアセトニトリル混液による条件をもとに、ラック色素及びクチナシ黄色素などについても検討した。アントシアニン系色素、ラック色素、コチニール色素等は良好に分析できたが、クチナシ黄色素の一部の成分と、ウコン色素のピークがブロードになることから、更に、グラジエント条件を検討した。その結果、20分から30分の間で、A液とB液の混合比を70%対30%から40%対60%に直線的に増加させるグラジエント条件が、これらの分離に良好であることが分かった。この方法により14種類の着色料を一つの条件で同時に分析することが可能となった。各色素のHPLCによるクロマトグラムを図1. に示した。

2. 標準色素の分析

上記HPLC条件で分析した天然色素14種類の各標準溶液の紫外可視吸収スペクトルを図2. に示した。アント

シアニン系色素は、その特徴を示す2つの吸収スペクトルを、その他は各色素のHPLCの主なピークの吸収スペクトルを示した。

赤色系色素はアントシアニン系色素8種及びベニコウジ色素1種の9種類であった。アントシアニン系色素8種のそれぞれのピークの成分名を表1. に示した。これらの成分名は、これまでの報告^{1,3,4)}から推定された。アントシアニン系色素は、530nm付近に極大吸収を持っていた。そのうち、ハイビスカス色素、ポイセンベリー色素、ブラックカーン色素、及びエルダーベリー色素のすべてのピークが、保持時間10分までに溶出した。ポイセンベリー色素（ピーク1）とエルダーベリー色素（ピーク³⁾のように同一色素成分をもつ色素もあることから、各色素は完全には分離しないピークもあるが、各色素は、その特徴的なスペクトルパターンから確認された。ムラサキトウモロコシ色素、ブドウ果皮色素、赤キャベツ色素及びムラサキイモ色素は保持時間25分までにすべてのピークが溶出された。そのうち、赤キャベツ色素（ピーク1・2）及びムラサキイモ色素（ピーク1・2・3）については、530nmの他に330nm付近にアシル基をもつ色素成分のピークによるもう一つの極大吸収があった。

ベニコウジ色素は、10本以上のピークから成り、これらは530nm付近に極大吸収を持つことが分かった。この色素成分の保持時間は、35分以降に溶出され、アントシアニン系色素とは保持時間が異なることから確認できた。

橙色系色素は、コチニール色素及びラック色素の2種類であった。コチニール色素は、490nm付近に極大吸収を持つ1本のピーク（ピーク1）から成っており、これは、カルミン酸によるものであった。一方、ラック色素は、490nm付近に極大吸収を持つ、3つのピークから成ることが分かった。これらは、ラッカイン酸C（ピーク1）、E（ピーク2）及びA、B（ピーク3）であることが平田ら¹⁾の報告から推定された。この2種類の色素は、保持時間及び吸収スペクトルの違いから容易に確認できた。

黄色系色素は、クチナシ黄色素、ベニバナ黄色素及びウコン色素の3種類であった。クチナシ黄色素は、7本のピークから成ることが分かった。これら7本のピークは、市ら²⁾の報告から、表2. に示した成分であることが推定された。これらのピークはすべて、430nm付近に極大吸収を持っていた。ベニバナ黄色素は、10本以上の

*）平田ら：日本食品衛生学会第74回学術講演会講演要旨集，p48，1997。

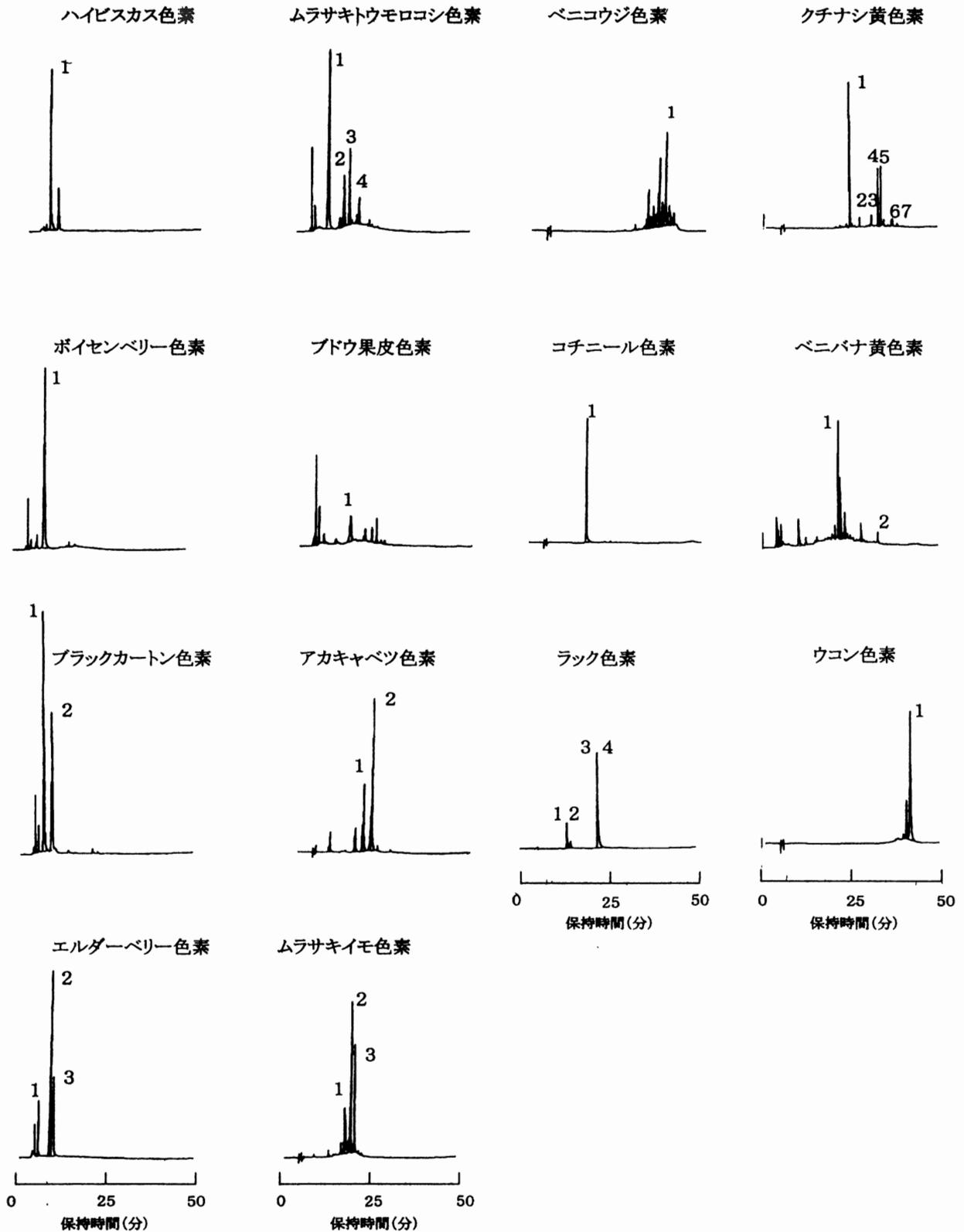
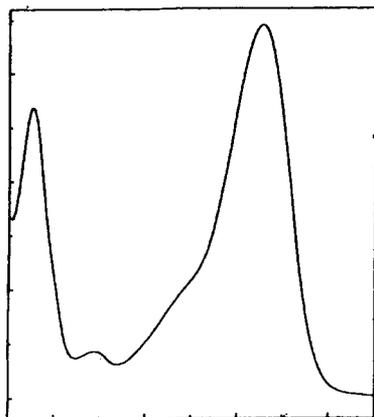


図1. HPLCによる天然着色料の標準色素のクロマトグラム

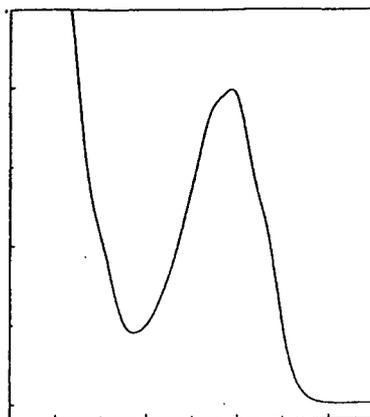
測定波長 430nm (クチナシ黄, ベニバナ黄, ウコン)

測定波長 530nm (ハイビスカス, ボイセンベリー, ブラックカートン, エルダーベリー, ムラサキトウモロコシ, ブドウ果皮, アカキャベツ, ムラサキイモ, ベニコウジ, コチニール, ラック)

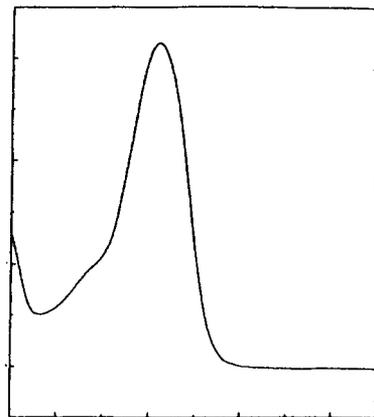
ブドウ果皮色素 (ピーク 1)



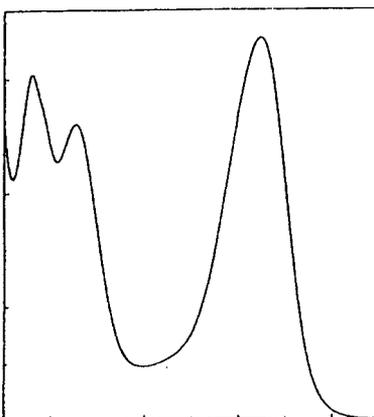
コチニール色素 (ピーク 1)



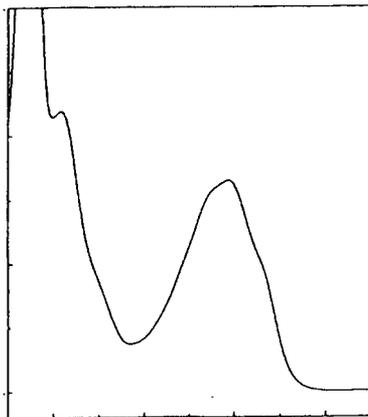
ベニバナ黄色素 (ピーク 1)



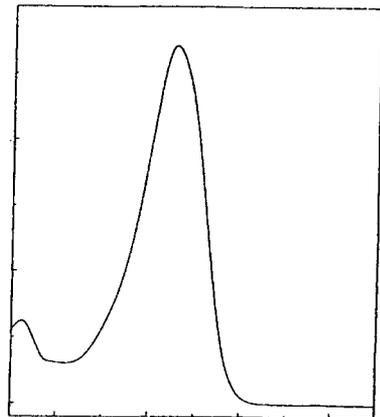
アカキャベツ色素 (ピーク 2)



ラック色素 (ピーク 4)

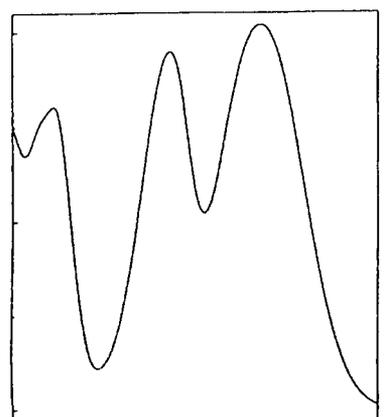


ウコン色素 (ピーク 1)



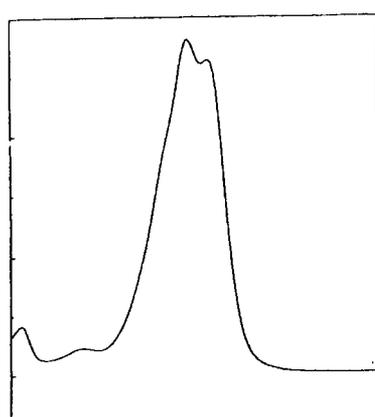
250 450 650
波長

ベニコウジ色素 (ピーク 1)



250 450 650
波長

クチナシ黄色素 (ピーク 1)



250 450 650
波長

図 2. 天然着色料の標準色素の紫外可視吸収スペクトラム

表1. アントシアニン系色素の成分

色素名	ピークNo	成分名
ハイビスカス色素	1	dephinidin 3-sambubioside
	2	cyanidin 3-sambubioside
ボイセンベリー色素	1	cyanidin 3-glucoside
	1	dephinidin derivative
ブラックカトン色素	2	cyanidin or peonidin derivatives
	1	cyanidin 3-sambubioside 5-glucoside
エルダーベリー色素	1	+cyanidin 3,5-diglucoside
	2	cyanidin 3-sambubioside
	3	cyanidin 3-glucoside
	4	cyanidin or peonidin derivatives
ムラサキトウモロコシ色素	1	cyanidin 3-glucoside
	2	pelargonidin derivatives
	3	cyanidin or peonidin derivatives
	4	cyanidin or peonidin derivatives
ブドウ果皮色素	1	malvidin derivative
アカキャベツ色素	1	cyanidin derivative
	2	cyanidin derivative
ムラサキイモ色素	1	cyanidin derivative
	2	peonidin derivative
	3	peonidin derivative

表2. クチナシ黄色素の成分

ピークNo	成分名
1	Crocetin digentiobioside ester (<i>trans</i>):crocin
2	Crocetin monogentiobioside monoglucoside ester (<i>trans</i>)
3	Crocetin monogentiobioside ester (<i>trans</i>)
4	Crocetin monogentiobioside ester (<i>cis</i>)
5	Crocetin diglucoside ester (<i>trans</i>)
6	Crocetin monoglucoside ester (<i>trans</i>)
7	Crocetin monoglucoside ester (<i>cis</i>)

ピークから成っていた。これらは405nm付近に極大吸収を持ち、2つのピークはサフラミンA（ピーク1）及びB（ピーク2）であることが合田ら⁵⁾の報告から推定された。ウコン色素は、430nm付近に極大吸収を持つピークが2本あり、このうちの主ピーク（ピーク1）がクルクミンであることが推定された。クチナシ黄色素（ピーク4）とベニバナ黄色素（ピーク2）は保持時間が同じであるが、各色素は、特徴的なクロマトグラムのパターンとそのピークの極大吸収により確認することが可能であった。ウコン色素は、そのピークの保持時間が35分以降に溶出されることから、クチナシ黄色素及びベニバナ黄色素と区別できた。

このように、このHPLC条件により、14種の天然着色料のすべてのピークを完全に分離することはできなかったが、各色素の特徴的なクロマトグラムのパターンとそのピークの極大吸収波長により確認することが可能であった。

3. 市販食品からの分析

本法を用いた市販食品の分析では、アントシアニンと表示されたゼリー中からブドウ果皮色素が、ラック色素と表示された飴中からラック色素が、クチナシ黄色素と表示された清涼飲料中からクチナシ黄色素が、クチナシ黄及びベニバナ黄色素と表示されたゼリー中からクチナシ黄及びベニバナ黄色素が検出された。すでに荻原ら⁶⁾により報告されているように、天然着色料は食品中に単独で用いられていることが多く、この場合は確認が容易である。また、本法を用いることにより、色素の組み合わせによっては、2種類の色素が含まれている食品でも分析可能であった。この分析法は、食品中の色素の検出に有効な方法であると考えられる。

ま と め

1. 天然着色料14種を、PDA検出器付きHPLCを用いて、同一条件で分析し、クロマトグラムパターンと吸収スペクトルから確認する方法を作成した。
2. 本分析法を用い市販食品中の色素の分析を行い、良好な結果が得られたことから、本法は、実用的な分析法であると考えられる。

文 献

- 1) 清水孝重, 中村幹雄: 食用天然色素, 49-151, 1993, 光琳, 東京.
- 2) 市隆人, 東村豊, 片山豪, 他: 食衛誌, 36-4, 482-489, 1995.

- 3) 佐藤恭子, 合田幸広, 米谷民雄: 日本食品化学学会誌, **12-1**, 1-5, 1995.
- 4) 清水孝重, 川原章弘, 中村幹雄, 他: 日本食品化学学会誌, **3-1**, 10-20, 1996.
- 5) 合田幸広, 鈴木淳子, 義平邦利: 衛生試験所報告, **106**, 101-105, 1988.
- 6) 萩原勉, 天川映子, 鎌田国広, 他: 東京衛研年報, **49**, 120-128, 1998.