

天然着色料の分析

Studies on Qualitative Analysis of Natural Food Colors in Foods

千葉 美子 山口 友美 平本 都香
柳 茂 齋藤 善則 濱名 徹

Yoshiko CHIBA, Yumi YAMAGUCHI, Kunika HIRAMOTO
Shigeru YANAGI, Yoshinori SAITO, Toru HAMANA

食品中の 10 種類の天然着色料を定性的に分析する試験法の確立を目的として、固相抽出法による精製後、LC/MS による分析法を検討した。試料に水を加えて超音波処理することにより試料中の色素を抽出し、Oasis HLB カートリッジに負荷した。次いでカートリッジを水で洗浄し、メタノールで色素を溶出した後、その溶出液を減圧下で濃縮乾固し、50%メタノールに溶解後、適宜希釈して LC/MS により定性を行った。清涼飲料を用いた添加回収試験では、対象とした 10 色素すべて 50%以上の回収率であった。本法を用いて市販食品中の天然着色料を分析したところ、良好な結果が得られたことから本法は実用的な方法と考えられる。

キーワード：既存添加物；天然着色料；高速液体クロマトグラフィー／質量分析法

Key words : existing food additives ; natural food colors ;

HPLC/mass spectrometry (LC/MS)

1 はじめに

着色料は、食品添加物の一つとして今や欠かせないものとなっている。このうち天然着色料は、消費者の“食の安全”に対する意識の高まりにより、多様な食品に高頻度で使用される傾向にあり、近年は使用量が大幅に伸びている。

天然着色料は、天然物由来で長年使用されてきた実績があるものとして既存添加物名簿に記載され、添加物として使用が認められている。しかし、化学的に合成された指定添加物とは異なり、毒性検査等に時間を要しているものもあることから、すべての天然着色料の安全性が科学的に確認されているわけではなく、ラック色素やコチニール色素など一部の色素では、アレルギー発症事例も報告¹⁾されている。

厚生労働省は、既存添加物について順次、食品健康影響評価を進めており、平成 16 年 7 月には幅広い食品群に対して使用されていた「アカネ色素」が、動物実験で高い発がん性が認められたため名簿から削除された²⁾。また、平成 19 年 3 月には、通知³⁾によりクチナシ色素等の一部の既存添加物にも規格を設定し、「第 8 版食品添加物公定書」にそれらの規格基準が収載された。

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うえ、原料の産地によりその成分組成が異なる。これらの色素の分析についてはこれまで種々の報告^{4)~10)}があるが、その大半が 1 ないし数種類の色素の定量を中心とした方法で、測定に使用する分析機器も多岐にわたっている。

そこで、10 種の天然着色料を定性的に簡便に分析することを目的とし、分析方法を検討したので、その

結果について報告する。

2 方法

2.1 分析対象色素

市販食品において使用頻度の高い天然着色料のうち、ADI（一日摂取許容量）が設定されているクチナシ青色素、クチナシ黄色素、ベニバナ黄色素、ウコン色素、ブドウ果皮色素、モナスカス（紅麴）色素、アナトー色素、カラメルⅢ色素、カラメルⅣ色素、アレルギー誘発の原因として疑いの持たれている、コチニール色素、ラック色素、既存添加物より消除されたアカネ色素について検討を行った。

2.2 試料

市販されていた食品のうち、天然着色料の使用表示があった漬物 3 件、飴 5 件、ガム 4 件、チョコレート 1 件、ゼリー 2 件、清涼飲料水 11 件を用いた。

2.3 標準品

アナトー色素、モナスカス色素、グレープスキニン色素（ブドウ果皮色素）は、和光純薬工業(株)製食品添加物試験用、クチナシ黄色素、ラック色素、ベニバナ黄色素は、関東化学(株)製食品分析用、カラメルⅢ色素、カラメルⅣ色素、コチニール色素は、関東化学(株)製特級、クルクミン（ウコン色素）、アリザリン（アカネ色素）は、和光純薬工業(株)製特級、ガーデニアブルー（クチナシ青色素）は、東洋インキ製造(株)製を使用した。

2.4 試薬

ギ酸は、和光純薬工業(株)製 LC/MS 用を、その他の試薬類は、関東化学(株)製高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

2.5 装置及び測定条件

LC及びMS条件を表1及び表2に、また、その条件により得られた標準溶液のLC/MSクロマトグラムを図1、図2、図3、図4に示した。

表1 LC測定条件

Agilent 1100 Series LC/MSD	
カラム:	Symmetry C18 (Waters) 3.5µm(150×2.1mm)
移動相:	A:1%ギ酸・B:アセトニトリル、グラジエント
流速:	0.2mL/min
カラム温度:	40°C
注入量:	5µL

表2 MS測定条件

分析条件	移動相グラジエント条件	MS条件	色素	指標成分	モニターイオン(m/z)
①	A/B 90/10 (0min) ↓ 50/50 (10min) ↓ 25/75 (20min)	イオン化法 ESI, Negative フラグメンター電圧 160V ネブライザーガス N ₂ , 40psi 乾燥ガス N ₂ , 12.0L/min 乾燥ガス温度 350°C キャピラリー電圧 4,500V	クチナシ青 クチナシ黄 ベニバナ黄	geniposide genipin geniposide genipin crocin safflomin A safflomin B	433[M-H+HCOOH] ⁻ 225[M-H] ⁻ 433[M-H+HCOOH] ⁻ 225[M-H] ⁻ 975[M-H] ⁻ 611[M-H] ⁻ 1043[M-H·H ₂ O] ⁻
	A/B 90/10 (0min) ↓ 50/50 (10min) ↓ 25/75 (20min) ↓ 25/75 (25min)	イオン化法 ESI, Negative フラグメンター電圧 100V ネブライザーガス N ₂ , 40psi 乾燥ガス N ₂ , 12.0L/min 乾燥ガス温度 350°C キャピラリー電圧 4,000V	コチニール ラック ウコン アカネ	carminic acid laccaic acid A laccaic acid B laccaic acid C curcumin demethoxycurcumin alizarin	491[M-H] ⁻ 536[M-H] ⁻ 538[M-H] ⁻ 495[M-H] ⁻ 367[M-H] ⁻ 337[M-H] ⁻ 239[M-H] ⁻
	A/B 90/10 (0min) ↓ 50/50 (10min) ↓ 25/75 (20min)	イオン化法 ESI, Positive フラグメンター電圧 60V ネブライザーガス N ₂ , 40psi 乾燥ガス N ₂ , 12.0L/min 乾燥ガス温度 350°C キャピラリー電圧 4,000V	ブドウ果皮 クチナシ黄	malvidin-3-Glu peonidin-3-Glu petunidin-3-Glu crocin	493[M+H] ⁺ 463[M+H] ⁺ 479[M+H] ⁺ 999[M+Na] ⁺
④	A/B 75/25 (0min) ↓ 50/50 (10min) ↓ 15/85 (20min) ↓ 15/85 (25min)	イオン化法 ESI, Positive フラグメンター電圧 140V ネブライザーガス N ₂ , 40psi 乾燥ガス N ₂ , 12.0L/min 乾燥ガス温度 350°C キャピラリー電圧 4,500V	アナトー モナスカス	norbixin rubropunctatin monascin monascorubrin ankaflavin	381[M+H] ⁺ 357[M+H] ⁺ 359[M+H] ⁺ 385[M+H] ⁺ 386[M+H] ⁺

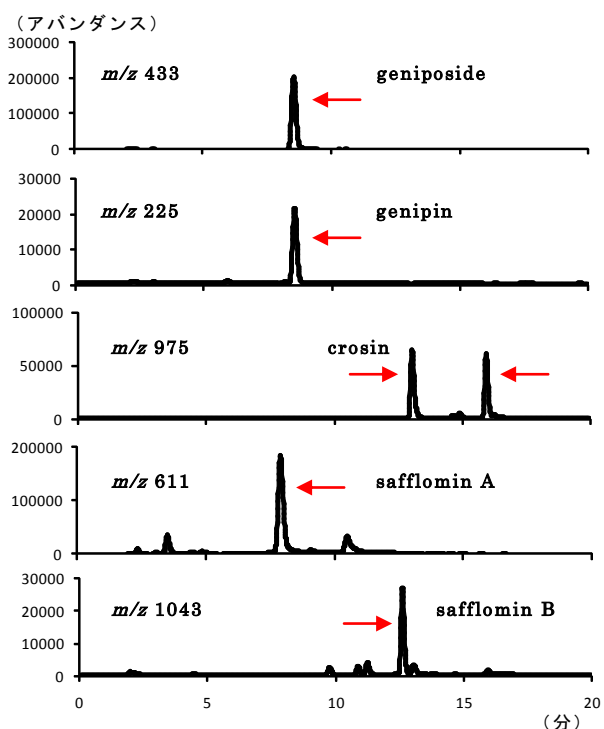


図1 分析条件①における標準溶液のクロマトグラム

2.6 試料溶液の調整

試料（飴は粉碎後、その他の試料は均一化したもの）3～5gを遠沈管に量り、精製水10～20mlを加えて超音波処理し、色素を抽出・溶解させた。この溶液を遠心分離（2,500rpm, 10min）し、上清をOasis HLBカートリッジに全量負荷した。カートリッジを精製水20mlで洗浄後、メタノール30mlを用いて色素を完全に溶出させた。溶出液を50°C以下で減圧濃縮乾固し、残渣を50%メタノールに溶解し、0.20µmのメンブランフィルターでろ過、適宜希釈して試料溶液とした。

3 結果及び考察

3.1 分析法の検討

3.1.1 抽出溶媒の検討

分析対象とした天然着色料の多くが酸性下で安定であったことから、抽出溶媒として0.1%ギ酸及び水を用いて検討を行った。アントシアニン系のブドウ果皮色素では水より0.1%ギ酸水溶液で抽出率が向上したが、アナトー色素やモナスカス色素など他の色素の抽出率が低下した。今回用いた試料からの抽出には、水のみ抽出の方が全体の抽出率が良好であった。

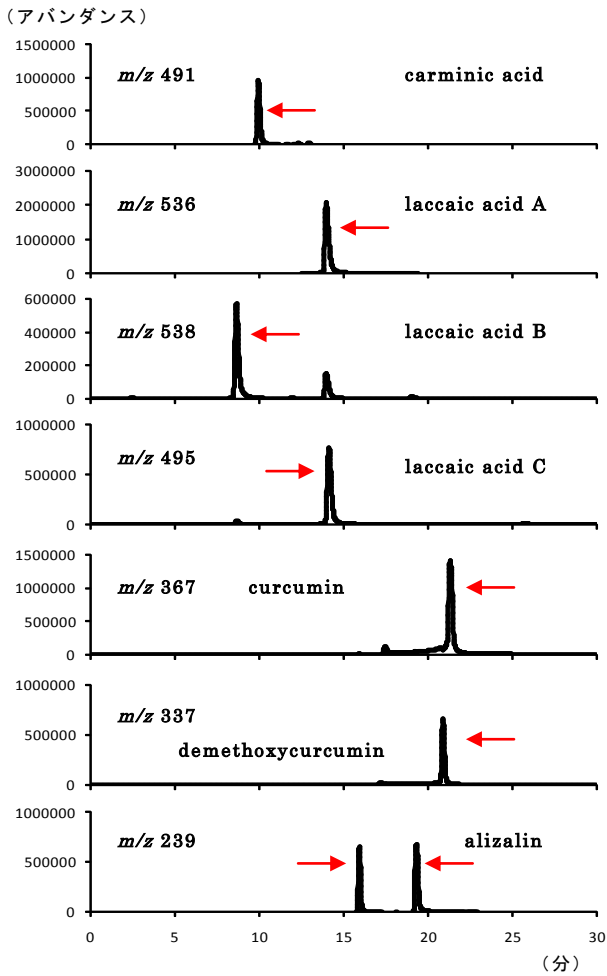


図2 分析条件②における標準溶液のクロマトグラム

3.1.2 精製法の検討

精製法は、操作の簡易性及び迅速性を考慮して固相抽出法を採用することとし、精製用カートリッジとして、Waters社製 Sep-Pak Vac C8(200mg), Sep-Pak Plus Short C18(360mg), Oasis HLB(200mg, 500mg), Oasis MAX(150mg)を使用前にメタノール 10ml 及び精製水 10ml でコンディショニングしたものをを用いて検討を行った。その結果 C8 では保持力が弱く、また MAX ではカラムに吸着したまま溶出できない色素があった。C18 及び HLB は共に回収率が 50%を超え、ほぼ同等の結果が得られたが、比較的少量の溶媒で溶出が可能なポリマー系の HLB カートリッジを用いることとした。また、HLB カートリッジの充填量による差は認められなかった。

3.1.3 LC/MS 測定条件の検討

安定した分析条件を保つため移動相は酸性とし、ピーク形状や感度を考慮してギ酸を用いることにした。

次にアセトニトリルとのグラジエント溶出とするため、その溶液濃度について検討した。A液：0.1%ギ酸、B液：0.1%ギ酸-アセトニトリルでのグラジエント溶出では、検出が困難なピークがあり、A液：0.2%ギ酸、

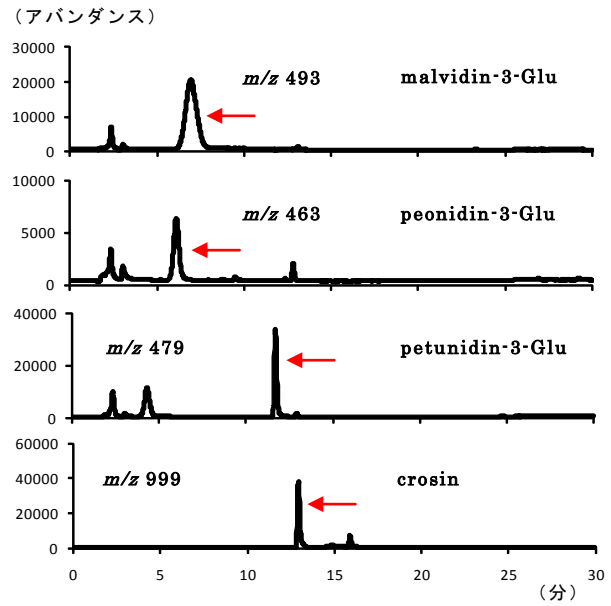


図3 分析条件③における標準溶液のクロマトグラム

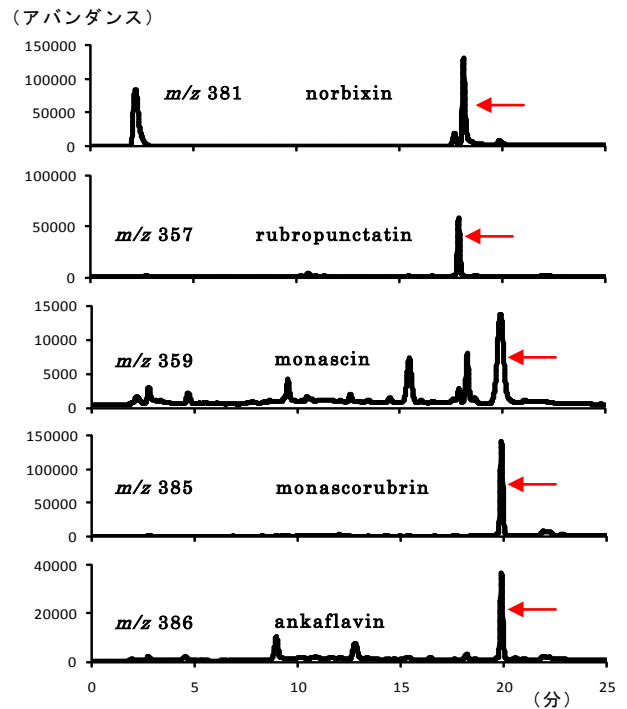


図4 分析条件④における標準溶液のクロマトグラム

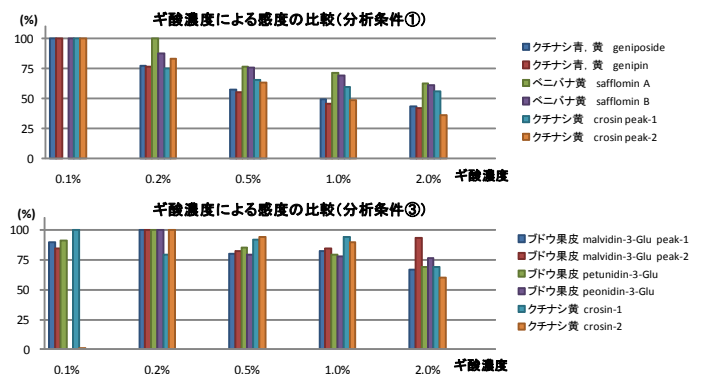


図5 移動相(ギ酸)濃度による感度の比較

B液：0.5%ギ酸-アセトニトリル以上は濃度が上昇

するにつれピークの分離は良くなったが感度の低下が見られた(図5)。グラジェント溶出の移動相B液にアセトニトリルを用いるため、分析条件④でモナスカ色素の指標成分ピークが出現する20分まで、移動相のギ酸濃度を0.2%付近に保てるよう、移動相A液のギ酸濃度を1%とし、アセトニトリルとのグラジェント分析とした。

また、ベニバナ黄色素は、サフロミンA(safflomin A)及びサフロミンB(safflomin B)を指標成分とした。コチニール色素は、カルミン酸(carminic acid)を、ラック色素は、ラッカイン酸A(laccaic acid A)、ラッカイン酸B(laccaic acid B)及びラッカイン酸C(laccaic acid C)を、ウコン色素は、クルクミン(curcumin)及びデメトキシクルクミン(demethoxycurcumin)を、アカネ色素はアリザリン(alizarin)を指標成分とした。ブドウ果皮色素は、マルビジン-3-グルコシド(malvidin-3-Glu)、ペオニジン-3-グルコシド(peonidin-3-Glu)及びペツニジン-3-グルコシド(petunidin-3-Glu)を指標成分とした。アナトー色素は、ノルビキシン(norbixin)を、モナスカ色素は、ルブロパンクタチン(rubropunctatin)、モナスシン(monascin)、モナスコルブリン(monascorubrin)及びアンカフラビン(ankaflavin)を指標成分として、それぞれの色素でMSの最適測定条件の検討を行った。しかし、構造式、分子量共に不明であるカラメル色素については、指標成分のターゲットイオンを確定できなかったため、カラメル色素を除く10色素の定性分析条件を決定した。

3.2 添加回収試験

ガス抜きを行った無色透明の炭酸飲料10mlに、対象とした色素10種をそれぞれ25ppm(試料換算)となるように添加して、本法により分析を行った。対象色素とその指標成分について、回収率及び変動係数を表3に示した。いずれの色素もほぼ50%を上回る回収率を確保でき、定性試験には十分な結果であった。

表3 色素の添加回収率 (n=4)

色素	指標成分	回収率(%)	変動係数(%)
クチナシ青	genipin	70	3.1
	geniposide	79	2.1
クチナシ黄	crosin	79	0.8
	safflomin A	75	3.4
ベニバナ黄	safflomin B	68	1.4
	malvidin-3-Glu	80	1.5
ブドウ果皮	petunidin-3-Glu	67	1.7
	laccaic acid A	49	12.1
ラック	laccaic acid B	96	2.0
	laccaic acid C	78	2.4
	carminic acid	96	2.4
コチニール	carminic acid	96	2.4
ウコン	demethoxycurcumin	53	3.5
	curcumin	89	4.6
アカネ	alizarin	86	3.7
モナスカ	ankaflavin	40	0.5
	monascin	83	2.3
アナトー	norbixin	87	0.6

3.3 市販食品の分析

市販食品26件(表示:クチナシ14件、ベニバナ8件、ウコン3件、紅麹2件、コチニール1件、アントシアニン7件、フラボノイド2件)について、本法を用いて定性分析を実施したところ、アントシアニン表示の7件中3件からブドウ果皮色素を、フラボノイド表示の2件中1件からベニバナ黄色素を、他の1件からブドウ果皮色素を検出した。その他の表示のものからは表示通りの色素を検出した。飴から検出したベニバナ黄色素とクチナシ黄色素の検出例を図6に示す。用いて定性分析を実施したところ、アントシアニン表示の7件中3件からブドウ果皮色素を、フラボノイド表示の2件中1件からベニバナ黄色素を、他の1件からブドウ果皮色素を検出した。その他の表示のものからは表示通りの色素を検出した。飴から検出したベニバナ黄色素とクチナシ黄色素の検出例を図6に示す。

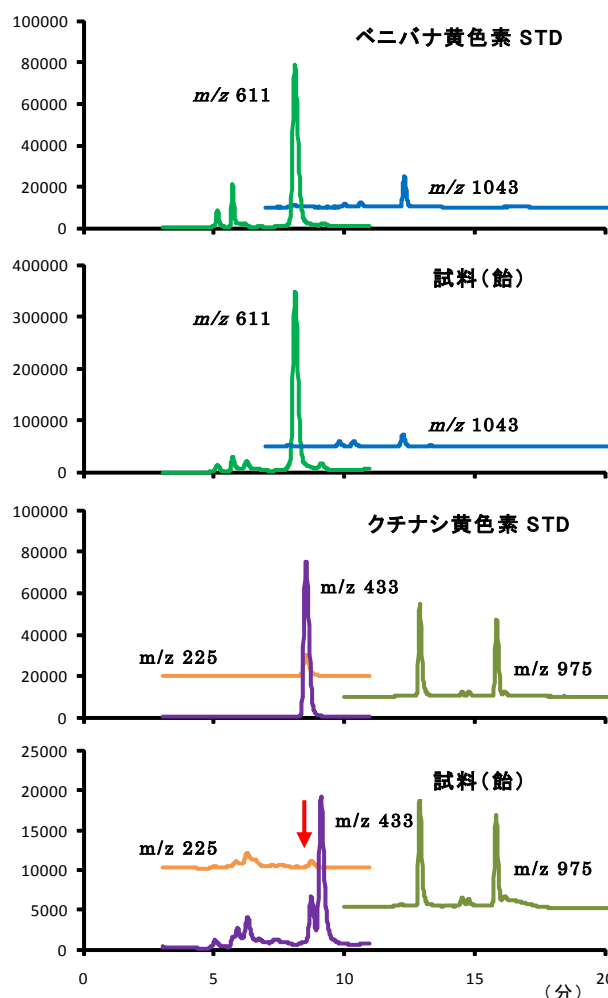


図6 標準液及び試料のLC/MSクロマトグラム

4 まとめ

LC/MSを用いて、食品中の天然着色料（クチナシ青色素、クチナシ黄色素、ベニバナ黄色素、ウコン色素、ブドウ果皮色素、モナスカス（紅麴）色素、アナトー色素、コチニール色素、ラック色素、アカネ色素）の定性試験法を検討した。食品から色素を抽出する溶媒に精製水を用いて超音波処理により抽出を行い、Oasis HLBカートリッジによる精製後、LC/MSにより定性を行う分析法を確立した。清涼飲料を用いた添加回収試験では、対象とした10色素すべてにおいて回収率50%以上を確保でき、定性分析が可能であるとして市販食品の色素を分析したところ、良好な結果が得られたことから、本法は実用的な方法と考えられる。

5 参考文献

- 1) 山川有子, 西村百合香, 掛水夏恵, 相原道子, 山川正, 大砂博之, 池澤善郎: コチニールによる即時型アレルギー, アレルギー, Vol.53, No.8, 903 (2004)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“既存添加物名簿の一部を改正する件について”平成16年7月9日, 食安発第0709001号 (2004)
- 3) “食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件について”平成19年3月30日, 食安発第0330001号 (2007)
- 4) 伊藤誉志男, 中澤裕之, 岡尚男, 岸弘子, 笹尾忠由, 扇間昌規, 中村幹雄, 浜野孝, 堀江正一, 堀伸二郎, 山崎勝弘: 日本食品化学研究振興財団 特定研究 食品中の食品添加物分析法の開発及び改良に関する研究, 平成13年度研究報告書, 138-152, 157-163 (2002)
- 5) 伊藤誉志男, 中澤裕之, 岡尚男, 岸弘子, 扇間昌規, 中村幹雄, 浜野孝, 堀江正一, 堀伸二郎, 山崎勝弘: 日本食品化学研究振興財団 特定研究 食究, 平成14年度研究報告書, 133-142 (2003)
- 6) 清水孝重, 川原章弘, 中村幹雄, 加藤喜昭, 合田幸広, 米谷民雄: 食品中からのアントシアニン系色素の分析法, 日本食品化学学会誌, Vol.3, No.1, 10-20 (1996)
- 7) 川原章弘, 加藤喜昭, 香田隆俊, 中村幹雄, 清水孝重: 食品中からのアカダイコン色素の分析法, 日本食品化学学会誌, Vol.5, No.1, 79-84 (1998)
- 8) 西沢信, 長南隆夫, 赤城幾代, 杉井孝雄: 天然着色料の分析法に関する研究 (第1報) 食品及び色素製剤中のアナトー色素, クチナシ黄色素の分析, 北海道立衛生研究所報, 33, 28-34 (1983)
- 9) 西沢信, 長南隆夫, 堀義宏: 天然着色料の分析法に関する研究 (第3報) 食品および色素製剤中のコチニール色素, ラック色素の分析, 北海道立衛生研究所報, 35, 7-11 (1985)
- 10) 長南隆夫, 堀義宏, 西沢信, 杉井孝雄: 市販食品中の天然色素の使用実態調査, 北海道立衛生研究所報, 35, 34-39 (1985)